



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

갈조류 감태(*Ecklonia cava*)의
HT-1080 인간 섬유육종 세포 침윤 억제효과

Inhibition of invasion by the brown alga *Ecklonia cava*
in HT-1080 human fibrosarcoma cells



한국해양대학교대학원

해양생명환경학과

이진혁

本 論文을 이진혁의 理學碩士 學位論文으로
認准함.

위 원 장 이학박사 임선영 (인)

위 원 이학박사 윤원득 (인)

위 원 이학박사 서영완 (인)

2011년 2월

한국해양대학교 대학원

목 차

	Page
List of schemes -----	i
List of tables -----	ii
List of figures -----	iii
List of abbreviations -----	vi
List of symbols -----	vii
Abstract -----	1
1 서론 -----	5
2 재료 및 방법 -----	8
2-1. 재료 -----	8
2-2. 시약 -----	8
(1) 추출, 분획 및 분획 -----	8
(2) 활성 -----	8
2-3. 기기 -----	10
2-4. 추출, 분획 및 분리 -----	11
(1) 추출 및 분획 -----	11
(2) 총 Polyphenol 함량 측정 -----	13
(3) 화합물의 분리 -----	14
2-5. 항산화 활성 실험 -----	16
(1) DPPH radical 소거 활성 -----	16
(2) Peroxynitrire 소거 활성 -----	19
2-6. 세포수준에서의 활성 실험 -----	22
(1) 세포배양 -----	22
(2) Cell viability의 측정 -----	22

2-7. 세포수준에서의 항산화 실험 -----	25
(1) ROS (total free radical 측정) -----	25
(2) NO 생성 억제 효과 측정 -----	27
(3) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-----	29
2-8. HT-1080 세포침윤 억제 효과 측정 -----	30
(1) 시료 준비 -----	30
(2) Gelatin zymography -----	30
(3) MMP-2와 MMP-9의 RT-PCR -----	31
 3. 결과 및 고찰 -----	 32
3-1. 총 Polyphenol 함량 측정 -----	32
3-2. 감태에서 분리된 화합물들의 구조 결정 -----	33
3-3. <i>In vitro</i> 항산화 활성 -----	61
(1) DPPH radical 소거 활성 -----	61
(2) Peroxynitrite 소거 활성 -----	63
3-3. 세포 수준에서의 항산화 활성 -----	66
(1) Raw 264.7 cell에 대한 조추출물과 용매분획물의 MTT assay 효과 --	66
(2) 조추출물과 용매분획물의 ROS 소거 활성 -----	68
3-4. 항염증 활성 -----	71
(1) NO 생성 억제 효과 -----	71
(2) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) -----	73
3-5. HT-1080 세포침윤 억제 효과 -----	74
(1) 감태 조추출물과 용매분획의 활성 -----	74
1) HT-1080 cell에 대한 조추출물과 용매분획의 MTT assay 효과 ---	74
2) Gelatin zymography -----	76

3) MMP-2와 MMP-9의 RT-PCR -----	78
(2) 감태에서 분리한 compounds 2-6 활성 -----	81
1) HT-1080 cell에 대한 compounds 2-6의 MTT assay 효과 -----	81
2) Gelatin zymography -----	83
3) MMP-2와 MMP-9의 RT-PCR -----	85
4. 요약 및 결론 -----	87
5. 참고문헌 -----	90
6. 부록 -----	94



List of schemes

	Page
Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from <i>E. cava</i> . -----	12
Scheme 2. Isolation of the compounds 1-6 from <i>E. cava</i> . -----	15
Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect. -----	18
Scheme 4. Measurement of the ONOO ⁻ scavenging effect -----	21



List of tables

	Page
Table 1. Sequence of primer used for RT-PCR	29
Table 2. Sequence of primer used for RT-PCR	31
Table 3. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 2	37
Table 4. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 3	38
Table 5. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 4	39
Table 6. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 5	40
Table 7. ^1H NMR spectral data for compound 6	41
Table 8. ^{13}C NMR spectral data for compound 6	42
Table 9. DPPH radical scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from <i>E. cava</i> (EDA(%))	62
Table 10. Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from <i>E. cava</i> on ONOO^- from SIN-1	65
Table 11. Scavenging effect of crude extracts and its solvent fractions from <i>E. cava</i> on authentic ONOO^-	65

List of figures

	Page
Fig. 1. Photograph of <i>Ecklona cava</i> .	7
Fig. 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol.	17
Fig. 3. Peroxynitrite (ONOO ⁻) mediated oxidation of DHR123.	20
Fig. 4. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.	24
Fig. 5. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.	26
Fig. 6. Coloring reaction of NO ₂ ⁻ detection.	28
Fig. 7. Contents of total polyphenol in each solvent fractions from <i>E. cava</i> .	32
Fig. 8. Chemical structure of compounds 1-4 from <i>E. cava</i> .	43
Fig. 9. Chemical structure of compounds 5, 6 from <i>E. cava</i> .	44
Fig. 10. ¹ H NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD.	46
Fig. 11. ¹³ C NMR spectrum of compound 2 in CD ₃ OD.	46
Fig. 12. gDQCOSY spectrum of compound 2 in CD ₃ OD.	47
Fig. 13. TOCSY spectrum of compound 2 in CD ₃ OD.	47
Fig. 14. gHMQC spectrum of compound 2 in CD ₃ OD.	48
Fig. 15. gHMBC spectrum of compound 2 in CD ₃ OD.	48
Fig. 16. ¹ H NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	49
Fig. 17. ¹³ C NMR spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	49
Fig. 18. gDQCOSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	50
Fig. 19. TOCSY spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	50
Fig. 20. gHMQC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	51
Fig. 21. gHMBC spectrum of compound 3 in CD ₃ OD.	51
Fig. 22. ¹ H NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD.	52
Fig. 23. ¹³ C NMR spectrum of compound 4 in CD ₃ OD.	52

Fig. 24. gDQCOSY spectrum of compound 4 in CD ₃ OD.	53
Fig. 25. TOCSY spectrum of compound 4 in CD ₃ OD.	53
Fig. 26. gHMQC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD.	54
Fig. 27. gHMBC spectrum of compound 4 in CD ₃ OD.	54
Fig. 28. ¹ H NMR spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	55
Fig. 29. ¹³ C NMR spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	55
Fig. 30. gDQCOSY spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	56
Fig. 31. TOCSY spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	56
Fig. 32. gHMQC spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	57
Fig. 33. gHMBC spectrum of compound 5 in CD ₃ OD.	57
Fig. 34. ¹ H NMR spectrum of compound 6 in CD ₃ OD.	58
Fig. 35. ¹³ C NMR spectrum of compound 6 in CD ₃ OD.	58
Fig. 36. gDQCOSY spectrum of compound 6 in CD ₃ OD.	59
Fig. 37. TOCSY spectrum of compound 6 in CD ₃ OD.	59
Fig. 38. gHMQC spectrum of compound 6 in CD ₃ OD.	60
Fig. 39. gHMBC spectrum of compound 6 in CD ₃ OD.	60
Fig. 40. Effect of crude extract and solvent fractions from <i>E. cava</i> on viability of Raw 264.7 cell.	67
Fig. 41. Effects of crude extract and solvent fractions from <i>E. cava</i> on viability of AGS cell.	69
Fig. 42. Effects of crude extract and solvent fractions from <i>E. cava</i> on viability of HT1080 cell.	70
Fig. 43. Effects of compounds 2-6 from <i>E. cava</i> on viability of HT1080 cell.	72
Fig. 44. Effects of crude extract and solvent fractions from <i>E. cava</i> on	73

intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in Raw 264.7 cells. The cell were incubated with different concentration (100, 50, 10 and 1 μ M) of the sample for 90 min.

- Fig. 45. Effects of crude extract and solvent fractions from *E. cava* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in Raw 264.7 cells. The cell were incubated with different concentration (100, 50, 10 and 1 μ M) of the sample for the indicated times (b-f) respectively. 75
- Fig. 46. Effects of crude extract and solvent fractions from *E. cava* on Nitrite production in Raw 264.7 cells. 77
- Fig. 47. Effects of crude extract and solvent fractions from *E. cava* on production of iNOS in Raw 264.7 cells. 79
- Fig. 48. Effects of solvent fractions from *E. cava* on inhibition of MMP-2 and MMP-9 in HT1080 cells. 80
- Fig. 49. Chemical structure of compounds 1-4 from *E. cava*. 94
- Fig. 50. Chemical structure of compounds 5, 6 from *E. cava*. 95



List of abbreviations

BHA	: butylated hydroxyanisole
BHT	: butylated hydroxytoluene
c	: concentration
CD ₃ OD	: deuterium methanol
CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
¹³ C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
Fig.	: figure
H ₂ O	: water
¹ H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HRFAB	: high resolution fast atom bombardment
Hz	: hertz (sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
IR	: Infrared
LRFAB	: low resolution fast atom bombardment
MeOH	: methanol
MS	: mass spectroscopy
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO•	: nitric oxide radical
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
•O ₂ ⁻	: superoxide anion radical
•OH	: hydroxyl radical
ONOO ⁻	: peroxynitrite
RNS	: reactive nitrogen species
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reverse phase
S	: substrate
SiO ₂	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
<i>v</i> _{max}	: maximal velocity

List of symbols

J	Coupling constant (Hz)
M^+	Molecular ion
m/z	Mass to charge
R_f	Rate of flow
δ	Chemical shift



Inhibition of invasion by the brown alga *Ecklonia cava* in HT-1080 human fibrosarcoma cells

Abstract

Phlorotannins are polyphenols formed by the polymerization of phloroglucinol and are thought to have multiple functions including herbivore deterrence, antifouling with epiphytes, UV protection, cell wall component, wound healing and adhesion to the substrate. Phlorotannins occur only in brown algae.

The edible brown alga *Ecklonia cava*, one of the main sources of phlorotannins, belongs to the family of Laminariaceae as a perennial plant and is widely distributed along the coast of South Korea and Japan. The collected samples of *E. cava* were air-dried on the shade and ground into powder. The powder was extracted repeatedly with MeOH for 3 hours under reflux condition. The crude extracts were partitioned between CH₂Cl₂ and H₂O. The organic layer was evaporated and re-partitioned between *n*-hexane and 85% aq. MeOH, and the aqueous layer was also re-partitioned between *n*-BuOH and H₂O.

Among four solvent fractions of the crude extract, total phlorotannins contents increased in the order of *n*-BuOH > 85% aq. MeOH > H₂O > *n*-hexane, showing concentration of 68.78, 22.89, 3.86, and 1.16 mg/mL, respectively. Antioxidant activities of crude extract and its solvent

fractions were evaluated using 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical, authentic ONOO⁻ and ONOO⁻-generated from SIN-1, occurrence of intracellular reactive oxygen species (ROS) and NO. The scavenging effect of each fraction on DPPH radical increased in the order of *n*-BuOH > *n*-hexane > 85% aq. MeOH > H₂O fractions. The excellent scavenging effects on both authentic ONOO⁻ and induced ONOO⁻-from SIN-1 were shown for all fractions except H₂O fraction. The *n*-BuOH fraction, *inter alia*, showed the highest scavenging activity, comparable with L-ascorbic acid at 0.1 µg/ml.

The levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were measured for the crude extract and its solvent fractions using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) as fluorescence probe in Raw 264.7 cells. All fractions except H₂O fraction significantly decreased level of intracellular ROS.

Reactive NO has been known to generate peroxynitrite that is a latent oxidizing agent of biomolecules, by the chemical reaction between NO and superoxide. Therefore, NO production is an important step in the regulation of NO-mediated diseases. To measure the inhibitory effects of crude extract and its solvent fractions on NO production in LPS-induced Raw 264.7 cells, nitrite accumulation was measured. Among them, *n*-BuOH and 85% aq. MeOH fractions exhibited potent inhibitory activities compared to control.

It has been well-known that elevated nitric oxide (NO) production and oxidative stress in macrophages contribute to development of chronic disease and the inflammatory process. During inflammatory process, large amounts of proinflammatory mediator-NO is generated by the iNOS. The mRNA expression level of iNOS in LPS-treated macrophage was examined in order to evaluate whether crude extract and its solvent fractions reveal antiinflammatory effects. The expression level of iNOS was significantly reduced by 85% aq.MeOH and *n*-BuOH fractions.

Matrix metalloproteinases (MMPs), a family of zinc-dependent endopeptidases, have been associated with tumor cell invasion and metastasis due to their ability to hydrolyze a variety of extracellular matrix (ECM). ROS can positively activate several matrix metalloproteinases (MMPs) that contribute vitally to an inflammatory network, and this activation can be blocked by an antioxidant. Of the MMPs, MMP-2 (the 72-kDa type IV collagenase) and MMP-9 (92-kDa type IV collagenase) have been explored extensively because they play a pivotal role in the degradation of ECM. The inhibitory effects of crude extract and its solvent fractions on MMP-2 and -9 were evaluated in HT1080 cells using RT-PCR and gelatin zymography. *n*-BuOH fraction significantly down-regulated mRNA expression levels of MMP-9 and -2, especially showing ~50% inhibition ratio for MMP-9. Phlorotannins isolated from *n*-BuOH fraction were also estimated for their inhibitory effect on MMP-2 and -9. All compounds inhibited dose-dependently mRNA expression levels

of MMP-2 and -9. Particularly, compounds **3** and **6** exerted the potent inhibitory effects on both MMP-2 and -9. On the other hand, compounds **4** and **5** strongly inhibited MMP-9 and -2, respectively. However, they seldom inhibited MMP-2 and -9, respectively.

In conclusion, present work demonstrated the nutraceutical properties of *E. cava*, especially the potential for its use as an antioxidant and antiinflammatory agent, and chemopreventive ingredient for cancer through MMP-2 and -9 mechanisms in addition to its original usage as food source.



1. 서론

과학기술의 발전과 함께 오늘날의 의료 수준 또한 급격한 성장을 이룩하였지만 이에 따른 환경오염과 각종 원인들에 기인한 스트레스의 증가, 그리고 식습관의 변화로 인해 현대인들은 발암성 물질 및 자극에 더욱 많이 노출되어졌고 이로 인한 암 발생과 사망자 수의 증가는 전 세계적 추세로 연 평균 남녀 각 1.3% 와 4.9%로 꾸준히 증가하고 있는 추세이다 (국가 암 정보센터, 2010). 20세기 이후부터 암에 대한 관심이 높아지면서 이에 대한 치료법의 개발 또한 높은 수준 연구가 진행되어 오고 있지만 대부분의 항암치료는 방사선을 이용하거나 강한 독성을 지닌 합성화학약품을 사용하는 것으로 이는 면역 기능과 조혈 기능에 심각한 이상을 초래한다는 것은 거의 일반화된 사실이다. 이러한 부작용을 감소시키고 암 세포만 선택적으로 억제시키기 위한 천연항암제 개발 연구가 수행되고 있기는 하지만 여전히 괄목할 만한 치료법은 밝혀지지 않고 있다.

암의 진행과정은 활성산소 등 각종 스트레스를 받은 DNA가 교란, 손상을 입어 암세포로 변해가는 과정인 initiation 단계, 분열과 증식으로 비정상적으로 증식하는 단계인 promotion 단계 및 침윤, 전이 등의 악성종양 유전자의 발현 과정인 progression 단계의 3단계로 구분된다. 전이는 초기 종양으로부터 전이성 암세포가 떨어져 나와 혈관이나 림프관으로 들어가서 다른 목표 조직으로 들어가 증식하여 2차 종양을 형성하게 되는 것을 말하는데 (Liotta, 1992) 이러한 전이가 일어나기 위한 중요한 요소 중 하나가 세포의 지지체 구조인 세포의 기질 (extracellular matrix, ECM)과 기저막 (basement membrane)의 단백질을 분해하는 것이다. 여기에 필요한 여러 가지 단백 분해 효소 중 serine proteinase와 metalloproteinase에 대한 연구가 많이 이루어져 있으며 ECM과 기저막의 주성분을 분해하는 기질 금속단백분해효소 (Matrix metalloproteinase, MMP)가 특히 중요한 역할을 한다 (Chambers et al., 1997; Yoon et al., 2003). MMP는 종양의 발생 과정에 있어서 전반적으로 증가하여 종양의 전이뿐만 아니라 종양조직에서의 신생혈관형성, apoptosis, 증식, 분화

등에도 중요한 역할을 한다 (McCawley et al., 2000; Renckens et al., 2006). MMP family는 20개 이상의 단백질 군으로 이루어지며, 기질 특이성에 따라 fibrillar collagen을 분해하는 collagenase (MMP-1, 8, 13), type IV collagen과 gelatin을 분해하는 gelatinase (MMP-2, 9), proteoglycan과 glycoprotein을 분해하는 stromelysin (MMP-3, 10, 11) 및 membrane-type MMP (MT-MMP)로 분류된다. 특히, MMP-2 (type IV collagenase, gelatinase A)와 MMP-9 (type IV collagenase, gelatinase B)은 암의 침윤과 전이에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 (Moon et al., 2000), 이는 기저막의 주요 구성성분이 type IV collagen이기 때문이다. 따라서 암세포에서 높은 수준으로 발현되는 MMP를 제어한다면 종양세포의 침윤, 전이를 억제하여 암의 진행을 조절하고 나아가 항암 치료에 긍정적인 방향을 모색할 수 있을 것으로 기대된다.

기존 항암제에서 나타나는 부작용을 줄이고 면역기능을 높여주면서 암세포에만 특이적으로 작용하는 천연물 유래의 MMPs 저해제를 찾기 위한 연구가 계속되어 지고 있다 (Ohtsuki et al., 2008). 이러한 천연물 중 식물에 많이 들어 있는 polyphenol은 MMPs 저해제로써의 역할 (Sil et al., 2010) 뿐만 아니라 대표적인 항산화 물질로써 최근 들어 식품, 음료와 건강 보조제로써 관심을 받고 있다. 항산화제는 식품이나 유기물의 산화나 인체의 노화 등과 관련하여 금속이온의 킬레이트화 기능과 superoxide dismutase의 활성화와 효소유사활성에 의한 radical 반응을 종결시키는 기능을 통해 세포기능 장애, 동맥경화 및 당뇨 등 성인병 예방과 치료 효과에 탁월한 능력을 나타낸다 (Babizhayev et al., 1994).

생체는 감염, 염증 등의 자극에 의해 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 NO를 생성하여 종양세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염으로부터 생체를 지키는 중요한 역할을 하는데, 이 때 NO가 필요이상으로 과도하게 생성되면 세포내의 NAD를 고갈시키거나 (이보한 et al., 2007), DNA의 합성의 억제 (Kwon et al., 1991) 또는 돌연변이의 유발 (Nguyem et al.,

1992) 등에 영향을 미치며, superoxide radical과 반응하여 peroxynitrite (ONOO^-)를 형성하여 조직손상을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다 (Beckman et al., 1990). 이와 관련하여 polyphenol은 NO의 생성을 억제하는 항염증 작용에 있어서도 그 우수한 효과가 보고되어져 있다 (Shanmugam et al., 2008).

본 연구에 사용된 감태 *Ecklonia cava*는 우리나라와 일본 연안에서 주로 서식하는 갈조식물 다시마목(Laminariales) 미역과(Alariaceae)의 식물이다 (Fig. 1.). 길이는 1~2 m 이고 줄기는 원기둥 모양이며, 밑동은 식물의 뿌리 모양의 형태를 하고 있다. 점심대의 깊은 곳에 서식하며, 해중림을 구성하는 조류식물로서 전복과 소라의 먹이가 되어 연안생태계에서 1차생산자로서의 중요한 기능을 담당하고 있다. 최근에는 감태로부터 분리된 polyphenol을 이용하여 각종 건강 기능성 음료, 치약, 샴푸, 화장품 등에 이용되면서 그 효용성을 인정받고 있다. 본 연구에서는 감태가 함유하는 이차대사산물인 polyphenol 화합물을 분리하고 그 생리활성을 탐색하여 화합물 수준에서의 항산화, 항염증 그리고 항암 물질로서의 개발 가능성을 탐색하였다.



Fig. 1. Photograph of *Ecklonia cava*.

2. 재료 및 방법

2-1. 재료

2004년 5월 제주도 애월읍 귀덕리에서 채집한 감태(*Ecklonia cava*)를 구입하여 실험에 사용하였으며, 응달에서 건조한 후 분쇄기로 갈아서 추출하였다.

2-2. 시약

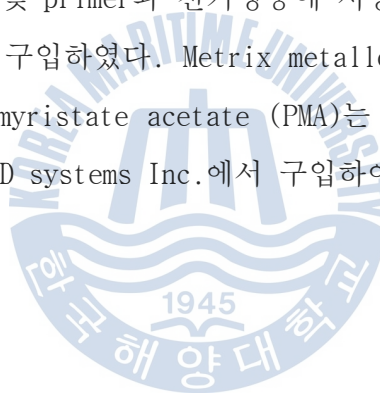
(1) 추출, 분획 및 분리

Column chromatography에 사용된 모든 용매는 1급 시약을 구입하여 사용하였다. Sephadex column chromatography에는 sephadex LH-20 (bead size 25~100 μm , Sigma)를 사용하였고, silica column chromatography에는 silica gel (YMC-Pack SIL, 12 nm, S-5 μm , 250 \times 10 mm I.D., YMC, USA)을 사용하였으며, high performed liquid chromatography (HPLC)는 YMC-pack ODS-A column (250 \times 10 mm, S-5 μm , 12 nm) 및 guard column (7.5 \times 4.6 mm, Alltech)을 사용하여 정제·분리하였다. NMR 측정 시 사용한 용매는 CD_3OD (Merck, deuterium degree 99.95%)를 사용하였다.

(2) 활성화

항산화 실험에 사용된 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)과 dihydrorhodamine 123 (DHR 123), penicillamine (DL-2-amino-3-mercapto-3-methyl- butanoic acid) 은 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Peroxynitrite (ONOO^-)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 필요한 DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)과 RPMI-1640 은 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였다. FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin 그리고 100 units/mL Penicillin-Streptomycin은 GIBCO사 (USA) 로부터 구입하여 사용하였다. MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. ROS 측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다. Lipopolysaccharide (LPS)와 Griess 시약인 sulfanilamide, NED는 sigma 사에서 구입하였다. mRNA 발현에 사용된 iNOS (inducible nitric oxide synthase, forward 5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3', reverse 5'-CAC-AGA-ACT-GAG-GGT-ACA-3'), GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, forward 5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3', reverse 5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3') 유전자 및 primer와 전기영동에 사용된 agar, EtBr (ethidium bromide)는 Sigma사에서 구입하였다. Matrix metalloproteinase (MMP) 발현의 측정에 사용된 Phorbol myristate acetate (PMA)는 Sigma 사에서 구입하였으며, MMP-2와 MMP-9 은 R&D systems Inc.에서 구입하여 사용하였다.



2-3. 기기

^1H -NMR과 ^{13}C -NMR, two-dimensional NMR 실험은 모두 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다. Varian RI detector와 high performance liquid chromatography (HPLC, Dionex p580)를 사용하여 화합물을 정제·분리하였다. 항산화 활성 및 MTT 등의 측정에 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (Bio-TEK instruments, USA)를 사용하였다. 세포의 배양은 CO_2 incubator (Forma Scientific, Japan)를 사용하였고, 유전자의 증폭에 PCR (BIORAD, USA)를 사용하였으며, 전기영동에 Mupid-2plus (Takara, Japan)를 사용하였다. 그 외에 rotary Evaporator (EYELA, JAPAN), vacuum pump, pH meter, water bath, pipet (JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다.

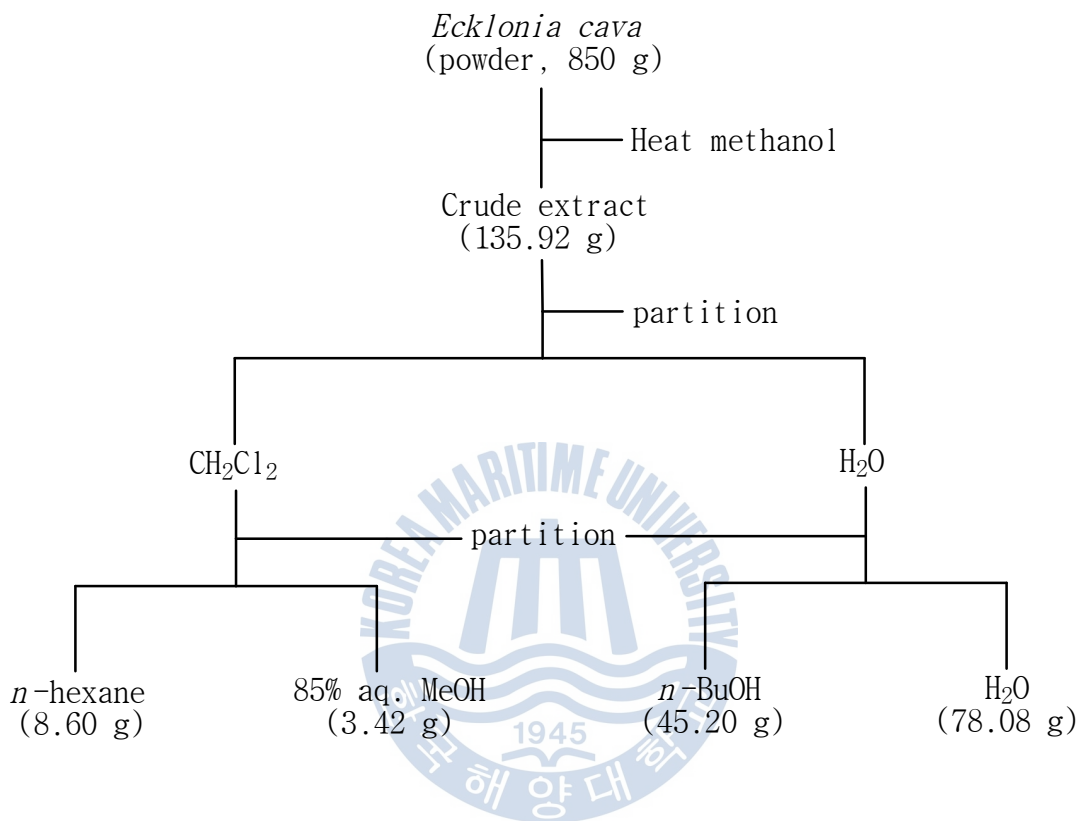


2-4. 추출, 분획 및 분리

(1) 추출 및 분획

제주 귀덕에서 구입한 감태(*Ecklonia cava*)를 응달건조 후 상온에서 보관하여 850g을 분쇄기로 갈아서 추출에 사용하였다. Heating mantle을 사용하여 methanol(MeOH) 용매를 끓는점 까지 가열하여 12시간 추출하는 과정을 3번 반복하였으며, 얻어진 추출액을 40 °C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (EYELA JAPAN, N-N series)로 농축하여 얻어진 추출물을 다시 상온 상태의 MeOH에 녹인 후 농축하여 desalting된 추출물을 얻었다 (Crude extract : 135.92 g). 조추출물 57.25 g은 용매 극성에 따라 순차적으로 분획하여, *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O 분획물을 각각 8.60 g, 3.42 g, 45.20 g, 78.08 g 얻었다 (Scheme 1).





Scheme 1. Preparation of crude extraction and its solvent fractions from *E. cava*.

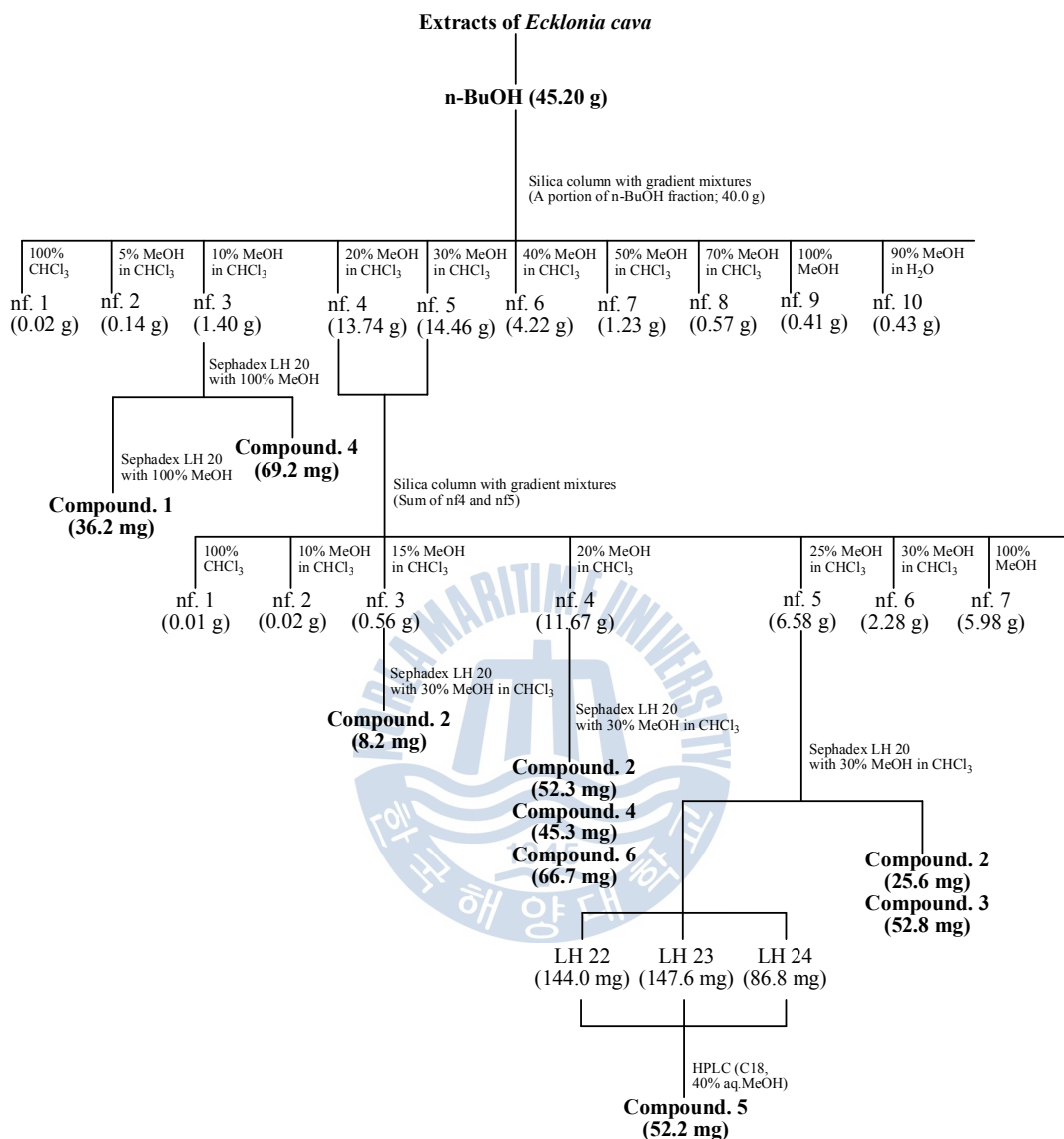
(2) 총 Polyphenol 함량 측정

각각의 분획물에 대한 polyphenol 함량을 Folin-Denis 방법 (Folin et al., 1912) 을 변형한 방법으로 측정하였다. 1 mg/mL(0.1% stock)의 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O 의 각 분획물 20 μ L에 250 μ L의 H₂O와 250 μ L Folin-Denize reagent을 가하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 70 $^{\circ}$ C에서 H₂O로 녹인 35%의 Na₂CO₃를 500 μ L씩 넣어 실온에서 20분간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량은 Tannic acid를 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다.



(3) 화합물의 분리

감태 분획물의 polyphenol 함량 측정 결과와 ^1H NMR 분광분석 자료를 토대로 *n*-BuOH 분획물에 대해 CHCl_3 와 MeOH의 혼합용매를 사용하여 NP flash column chromatography (nfc)를 실시하여 100% CHCl_3 (nf. 1), 5% MeOH in CHCl_3 (nf. 2), 10% MeOH in CHCl_3 (nf. 3), 20% MeOH in CHCl_3 (nf. 4), 30% MeOH in CHCl_3 (nf. 5), 40% MeOH in CHCl_3 (nf. 6), 50% MeOH in CHCl_3 (nf. 7), 70% MeOH in CHCl_3 (nf. 8)과 100% MeOH (nf. 9) 그리고 90% MeOH in H_2O (nf. 10) 용매 분획을 얻었다. 얻어진 각각의 분획을 ^1H NMR 분광분석 자료와 시료의 양을 고려하여 nf. 3 fraction에 대해 Sephadex LH 20를 이용하여 100% MeOH 용매로 분리하였다. 총 13개의 subfractions을 얻었으며, 그 중 subfraction 9-11에서 compound 1과 subfraction 3, 4에서 compound 4를 얻었다. 또한, nf. 4와 nf. 5를 합하여 다시 nfc를 실시하여 100% CHCl_3 (nf. 1), 10% MeOH in CHCl_3 (nf. 2), 15% MeOH in CHCl_3 (nf. 3), 20% MeOH in CHCl_3 (nf. 4), 25% MeOH in CHCl_3 (nf. 5), 30% MeOH in CHCl_3 (nf. 6), 그리고 100% MeOH (nf. 7) 용매 분획을 얻었다. 얻어진 분획중 nf. 3 fraction에 대해 Sephadex LH 20를 이용하여 30% MeOH in CHCl_3 용매로 분리하였다. 총 31개의 subfractions을 얻었으며, 그 중 subfraction 27에서 compound 2를 얻었다. nf. 4 fraction에 대해서도 동일하게 Sephadex LH 20를 이용하여 30% MeOH in CHCl_3 용매로 분리하였으며, 총 75개의 subfractions을 얻었다. 그 중 subfraction 18-23에서 compound 2를 얻었으며, subfraction 11-14와 subfraction 5-7에서 각각 compound 4와 6을 얻었다. nf. 5 fraction은 우선 Sephadex LH 20를 이용하여 30% MeOH in CHCl_3 용매로 분리하였으며, 총 32개의 subfractions을 얻었다. 그 중 subfraction 10, 11에서 compound 2와 subfraction 14-16에서 compound 3을 분리하였고, subfraction 22-24는 각각을 모두 합하여 reversed-phase HPLC (ODS-A, 40% aq. MeOH)를 이용하여 compound 5를 분리하였다 (Scheme 2).



Scheme 2. Isolation of the compounds 1-6 from *E. cava*.

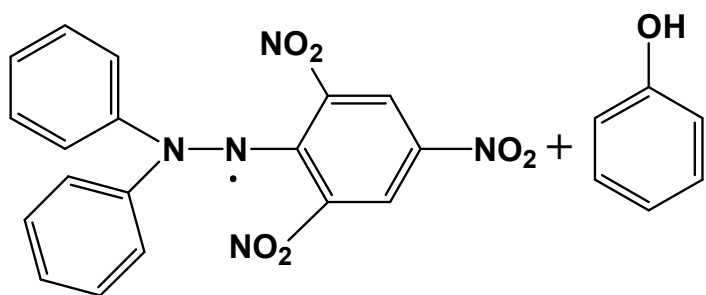
2-5. 항산화 활성 실험

(1) DPPH radical 소거 활성

1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 화학적으로 안정한 free radical 을 가지는 수용성 물질로써 진한 보라색을 띠며, 흡광도 518 nm의 파장에서 특이적인 흡수 band를 가진다. DPPH에 있는 radical이 phenol과 같은 수소나 전자를 제공해주는 전자 공여체와 반응하여 안정한 분자 diphenylpicrylhydrazine이 되면 본연의 보라색을 잃고 노란색을 띠게 되면서, 518nm에서 강하게 보이는 흡수 띠가 사라지게 된다. 반응에 비례하여 색이 변화하고 흡광도도 감소하게 되므로 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거 활성을 알 수 있다 (Fig. 2.). 이러한 DPPH radical 소거 작용은 광범위하게 쓰이는 간단한 항산화 검색법으로 phenol과 aromatic amines의 항산화 활성 측정에 많이 사용된다 (Blois, 1958).

각 농도별 시료 (0.1~50 µg/mL)를 MeOH 에 녹인다. DPPH 시약 2 mg을 EtOH 15 mL에 녹여 만든 DPPH 원액 1200 µL을 DMSO 500 µL와 EtOH 3000 µL에 혼합하여 DPPH 희석액을 준비한다. 준비된 DPPH 희석액은 cuvette에 넣고 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.94~0.97이 되도록 농도를 조절해 준다. 미리 준비한 시료 100 µL와 DPPH 희석액 900 µL를 10~20초간 vortex하여 섞고 10분 후에 UV 값 518 nm에서 측정한다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 free radical 소거활성을 백분율로 나타내었다 (Scheme 3).

$$\text{EDA (electron donating ability)(\%)} = \frac{\text{대조군 흡광도} - \text{실험군 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$



DPPH • (Violet, 518nm)

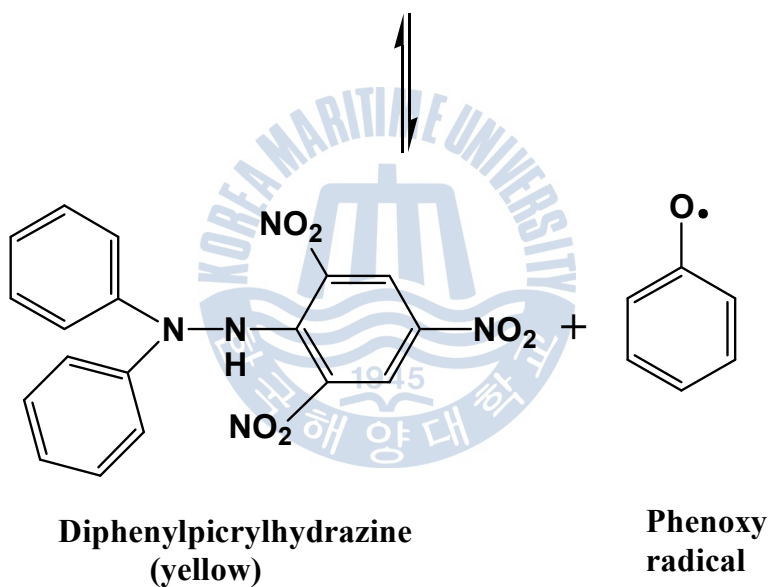
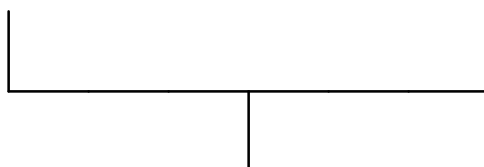


Fig. 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol.

MeOH solution of sample
at various concentrations

Solution of DPPH (2 mg)
in MeOH (15 mL)



Shaking vigorously (10–20 sec)

Standing at room temperature for 10 min.

O.D. check at 518 nm

Scheme 3. Measurement of DPPH radical scavenging effect.

(2) Peroxynitrite 소거 활성

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정함으로써 검색하였다 (Fig. 3.). DHR 123 (5 mM)을 dimethylformamide로 녹여서 stock 용액은 질소로 purge하여 -80 °C에 보관하고, DHR 123 (f.c. 5 μM) 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서, 사용하기 전에 조제하였다. Buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)와 5 mM potassium chloride, DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid) 100 μM (f.c.)을 혼합하여 조제하며 사용하기 전에 냉장 보관하였다. 이 buffer 용액에 DHR 123 용액을 혼합한 뒤 시료와 peroxynitrite 를 첨가하고 실온에서 5분간 방치한 후 multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT로 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실시하면서 실온에서 방치하는 시간만 1시간으로 조절하여 측정하였다. SIN-1에 의한 DHR 123에 의한 산화는 점진적으로 일어나는 반면에 authentic peroxynitrite는 아주 급속히 산화를 시키기 때문이다. Excitation 파장은 485 nm, emission 파장은 530 nm로 하였으며 실온에서 측정하였다. 그리고 ONOO⁻ (f.c. 10 μM)의 바탕용액은 0.3N NaOH를 사용하였고, 실험은 triplicate 로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다 (Kooy et al., 1994). (Scheme 4).

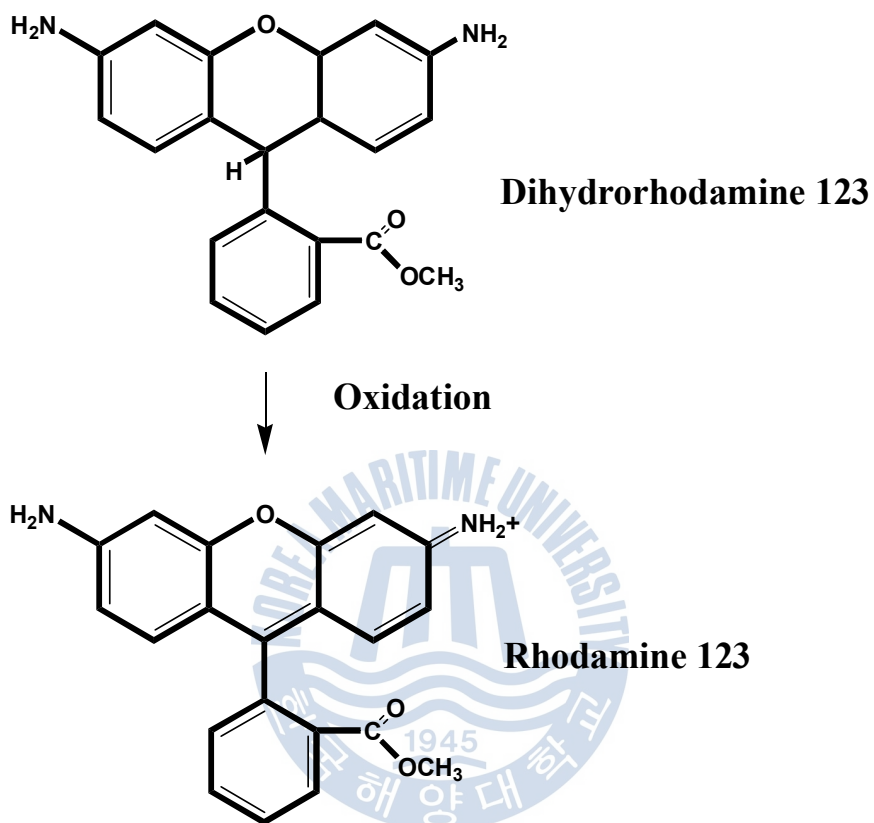


Fig. 3. Peroxynitrite (ONOO^-) mediated oolyxidation of DHR 123.

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μ M



Dihydrorhodamine 123 5 μ M



Incubation at 37 $^{\circ}$ C for 1 min



Sample



SIN-1 200 μ M or peroxynitrite 5 μ M



Measurement of fluorescence intensity

Excitation wavelength at 480 nm

Emission wavelength at 525 nm

Scheme 4. Measurement of the ONOO^- scavenging effect.

2-6. 세포수준에서의 활성 실험

(1) 세포배양

마우스 대식세포주인 Raw 264.7 세포와 인간 섬유육종세포주인 HT-1080 세포 그리고 인간 위암세포주인 AGS는 각각 한국 세포 주 은행 (KCLB, Korean cell line Bank)에서 구입하였다. Raw 264.7과 HT-1080은 100 unit/mL penicillin-streptomycin과 10% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 DMEM 배양액으로 배양하였고, AGS는 100 unit/mL penicillin-streptomycin과 10% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 RPMI 배양액으로 배양하였다. 모든 세포를 cell culture dish에서 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 2-3회 배지를 교환하고 6-7일 만에 PBS로 세척한 후 HT-1080과 AGS는 0.05% Trypsin-0.02 % EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양 하였고, Raw 264.7은 cell scraper로 분리하여 계대배양 하였다.

(2) Cell viability의 측정

MTT assay를 이용하여 감태의 이차대사산물이 cell viability에 미치는 영향을 확인할 수 있다. MTT assay는 세포의 증식과 세포의 살아있는 정도를 간접적으로 측정하는 것으로써 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용된다. 대사과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] crystal로 환원시킨다. 생성된 MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아 있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

Raw 264.7, HT-1080, AGS 세포 각각을 cell counting 하여 96 well

micro-plate에 1×10^5 cells/mL 로 100 μ L 씩 분주하여 37°C, CO₂ incubator 에서 24시간 배양하였다. 준비 된 농도별 시료를 각 well에 처리하고 24시간 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고 MTT 시약 5 mg을 1 mL PBS로 녹인 후, 10% FBS가 함유된 DMEM (AGS ; RPMI)배지 9 mL와 희석하여 각 well에 100 μ L 씩 처리하고 3~4시간 동안 incubation하여 formazan형성을 관찰하였다. Formazan이 형성되면 MTT 시약처리 배지를 제거하고 DMSO 100 μ L를 넣어서 10분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Fig. 4.).

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$



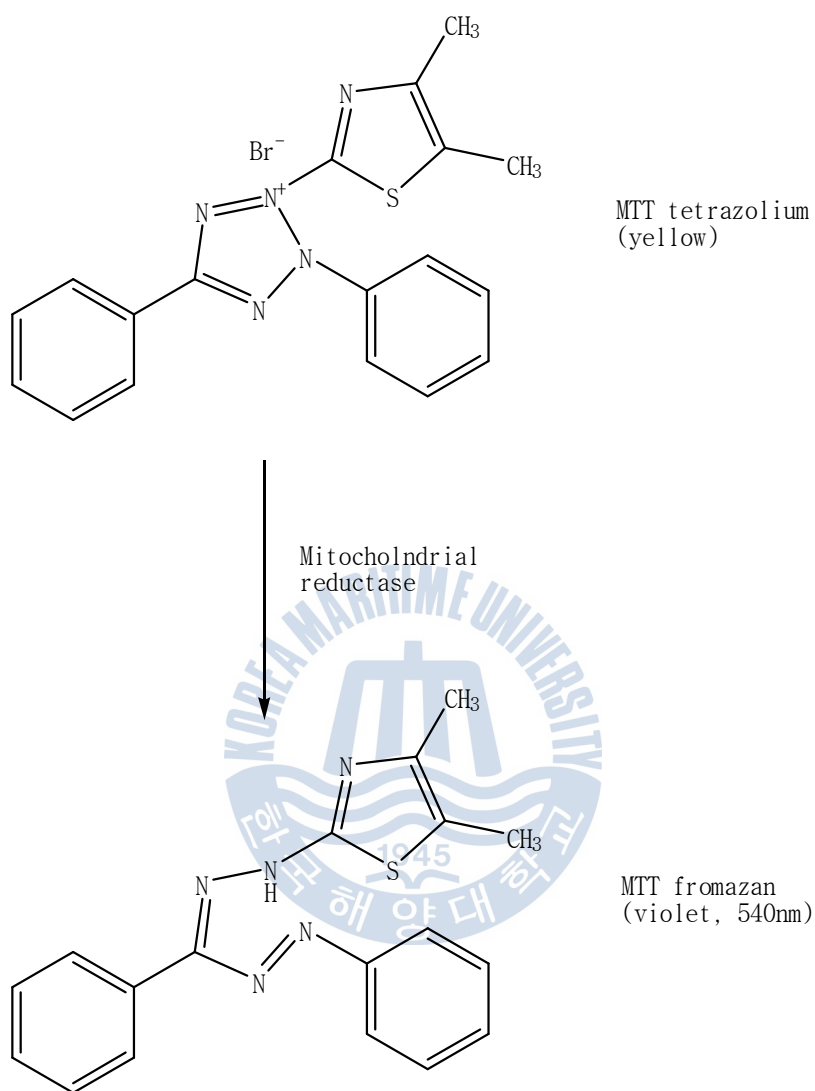
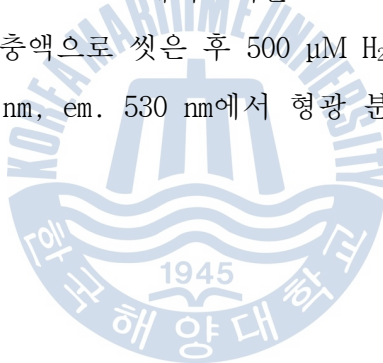


Fig. 4. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.

2-7. 세포수준에서의 활성 실험

(1) ROS (total free radical 측정)

세포의 free radical의 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다 (Okimotoa., 2000). DCFH-DA (fluorescence probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, sigma)는 세포내 활성산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포내의 활성산소 농도를 측정할 수 있다. Raw 264.7 세포를 96 well에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS 완충액으로 씻은 후 20 μ M DCFH-DA를 각 well에 주입하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 1시간 incubation한 후, DCFH-DA를 없애고 cell은 다시 PBS 완충액으로 씻은 후 500 μ M H₂O₂ 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 ex. 485 nm, em. 530 nm에서 형광 분석기로 측정하였다 (Fig. 5.).



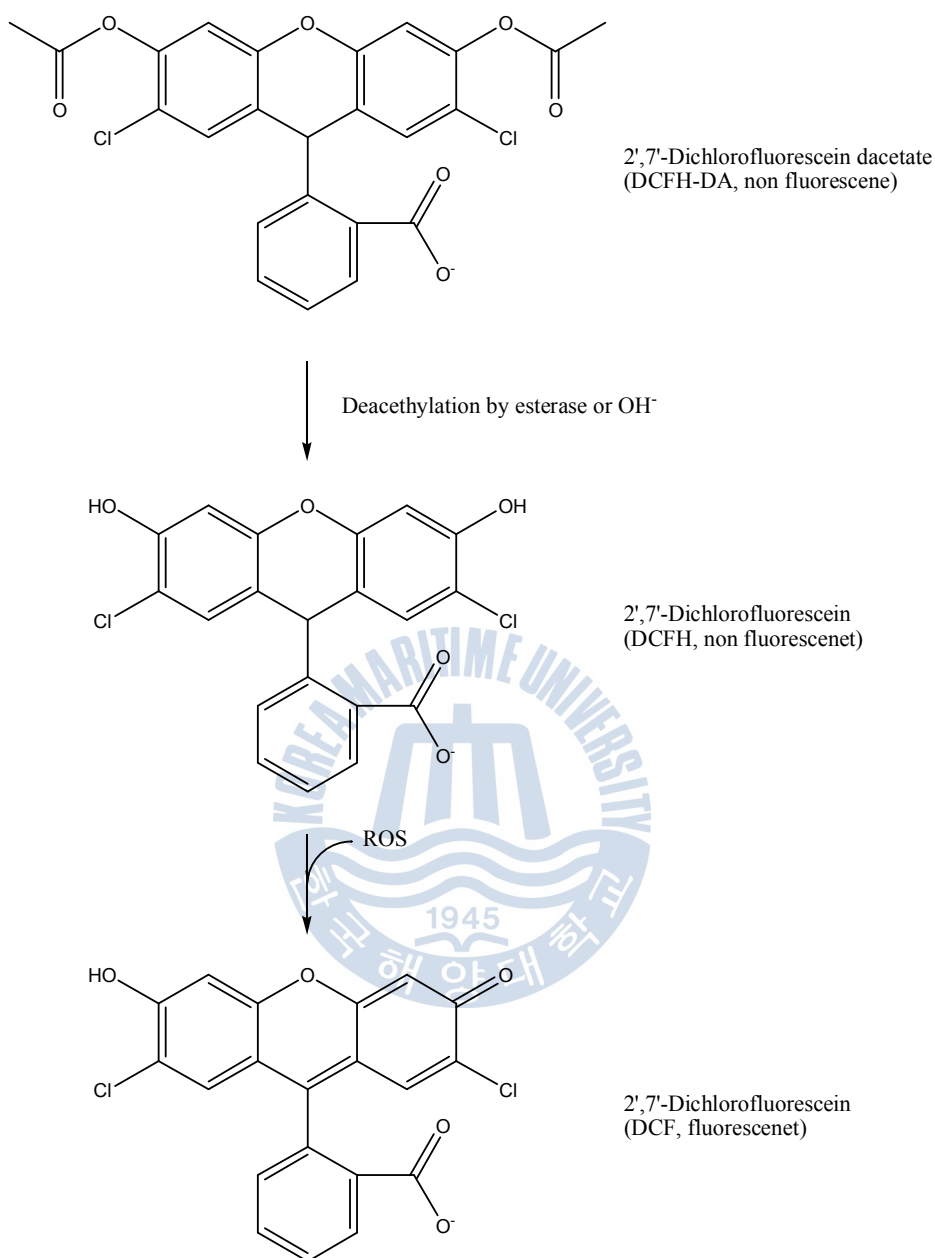


Fig. 5. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation-induced cellular system.

(2) NO 생성 억제 효과 측정

Nitric Oxide (NO) reduction assay는 macrophge의 주요 기능중 하나인 phagocytosis와 관련된 간접적인 활성측정의 한 방법으로 사용 된다. 1-Naphtylenediamine, Sulfanilamide 그리고 NO_2^- 가 반응하여 Azocoupling을 이루는데 이 두 개의 고리 형태가 550 nm의 파장에서 최대의 흡광도 값을 나타내며 이를 측정하여 간접적으로 NO의 생성량을 정량할 수 있다 (Beda et al., 2005) (Fig. 6.).

Raw 264.7 세포를 96 well micro-plate에 1×10^4 cells/mL 로 100 μL 씩 분주하여 37°C의 CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 Modified Eagle Medion (MEM)으로 교체한 후 준비된 sample을 1시간 동안 전처리 하고, NO 생성을 유도하기 위해 1 $\mu\text{g/mL}$ (1 ppm)의 LPS를 처리한 후, 48시간 동안 37°C의 CO_2 incubator에서 배양하였다. LPS에 의해 자극된 Raw 264.7세포로부터 생성된 NO가 함유된 배지 50 μL 에 Griess시약 (0.1% N-1-naphtylethylenediamine : 1% sulfanilamide = 1 : 1) 50 μL 를 반응시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrate를 사용하여 측정된 흡광도로 표준곡선을 작성하여 NO의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험 결과에 적용하여 생성된 NO의 함량을 정량하였다.

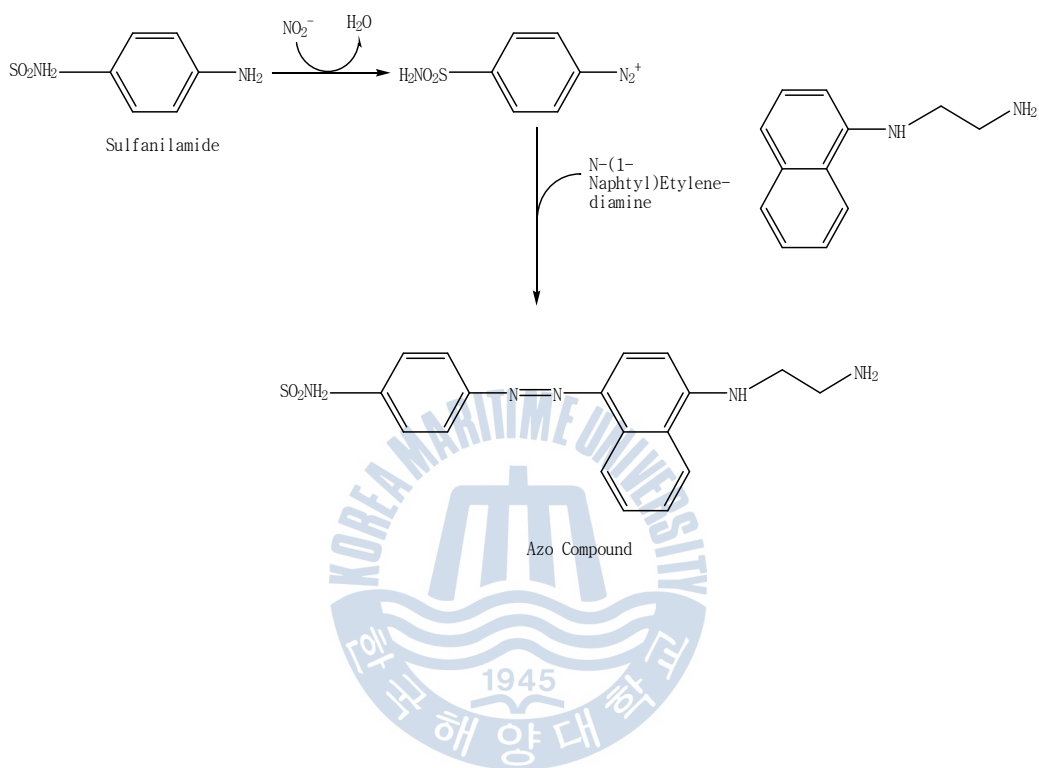


Fig. 6. Coloring reaction of NO_2^- detection.

(3) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

iNOS mRNA의 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다.

Raw 264.7 cell의 Total RNA를 Trizol (Invitrogen Co., CA, USA)을 이용하여 분리한 다음 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer (GIBCO, USA) 와 SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen)를 이용하여 2 µg의 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 사용하여 iNOS 유전자를 polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭하였고(Table 1), interanl coltrol로써 housekeeping 유전자인 GAPDH를 사용하였다. 각 PCR 산물들은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV를 통해 확인하였다.

Table 1. Sequence of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
iNOS	forward	5'-AGA-GAG-ATC-CGG-TTC-ACA-3'
	reverse	5'-CAC-AFA-ACT-GAG-GGT-ACA-3'
GAPDH	forward	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	reverse	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

2-8. HT-1080 세포침윤 억제 효과 측정

(1) 시료 준비

감태 이차대사산물의 MMP-2, MMP-9에 대한 효소적 활성을 검색하기 위하여 gelatin zymography를 실시하였다 (Herron et al., 1986). HT-1080 세포를 24 well plate에 1×10^7 cells/mL 로 500 μ L씩 분주하여 37°C의 CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. FBS와 penicillin을 첨가하지 않은 DMEM배지로 교환한 다음 각 well에 시료를 200, 100, 50, 10, 1 μ M 농도로 처리하고, 한 시간 후에 PMA 10 ng/mL를 처리한 다음 37°C의 CO₂ incubator에서 72시간 반응시켰다. 대조군으로 시료를 처리하지 않은 control과 시료와 PMA를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 배지를 e-tube에 모두 옮긴 후 4°C, 8000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 얻어진 상등액을 새로운 e-tube에 옮겼다. 시료가 농도별로 처리된 상등액을 동결건조 하여 농축한 후 zymography를 실시하였으며, pellet은 RT-PCR에 사용하였다.

(2) Gelatin zymography

10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate; SDS, polyacrylamide gel; PAGE)에 lane당 25 μ L H₂O로 녹인 시료를 4X loading buffer와 혼합한 후 전기영동 하였다. 전기영동 후 SDS를 제거하기 위해 gel을 renaturing buffer (2.5% Triton X-100)로 30분씩 2회 washing 하고 developing buffer (50 mM Tris base, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃)로 30분 동안 incubation 한 후에 새로운 developing buffer로 48시간 incubation 하여 기질분해를 유도하였다. 반응이 끝난 후에 staining buffer (2.5% Coomassie blue, 45% methanol, 10% acetic acid)에 담가 20분간 염색시킨 후 destaining buffer (methanol 25%,

acetic acid 10%)로 탈색시하였다. Gelatin이 분해되어 투명하게 나타나는 band의 크기를 통해 MMP-2와 MMP-9의 활성을 관찰하였다.

(3) MMP-2 와 MMP-9의 RT-PCR

감태의 이차대사산물이 MMP-2와 MMP-9 mRNA의 발현을 억제시키는지 RT-PCR을 통해 확인하였다.

PMA 처리 후 72시간이 지난 HT-1080 cell의 total RNA를 Trizol (Invitrogen Co., CA, USA)을 이용하여 분리한 다음 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer 와 SuperScript™ II reverse transcriptase를 이용하여 2 µg의 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 사용하여 MMP-2와 MMP-9 유전자를 PCR 방법으로 증폭하였고 (Table 2), internal control로써 housekeeping 유전자인 GAPDH를 사용하였다. 각 PCR 산물들은 1% agarose gel 을 이용하여 전기영동하고 EtBr을 이용하여 염색한 후 UV를 통해 발현을 확인 하였다.

Table 2. Sequence of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
MMP-2	forward	5'-GTG-CTG-AAG-GAC-ACA-CTA-AA-3'
	reverse	5'-TTG-CCA-TCC-TTC-TCA-AAG-TT-3'
MMP-9	forward	5'-CAC-TGT-CCA-CCC-CTC-AGA-GC-3'
	reverse	5'-GCC-ACT-TGT-CGG-CGA-TAA-GG-3'
GAPDH	forward	5'-CGG-AGT-CAA-CGG-ATT-TGG-TCG-TAT-3'
	reverse	5'-AGC-CTT-CTC-CAT-GGT-GGT-GAA-GAC-3'

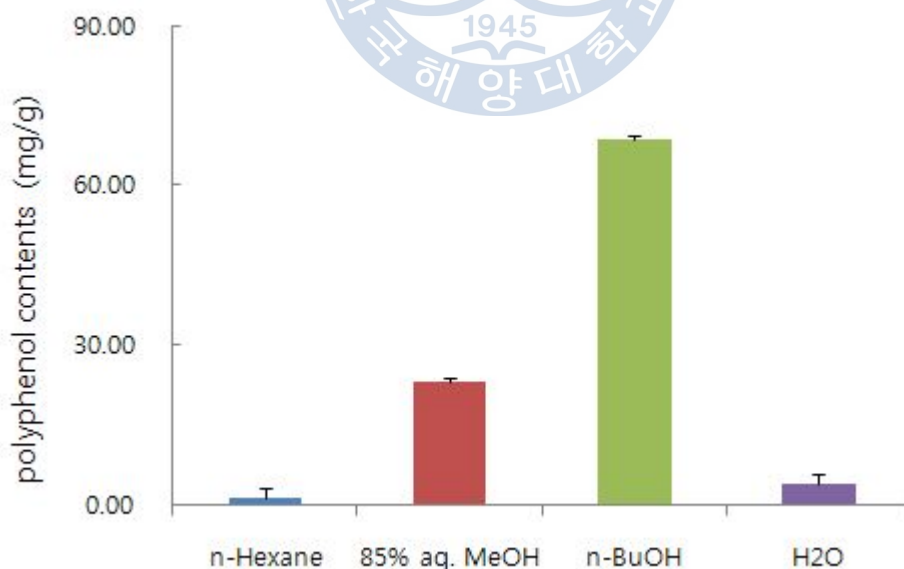
3. 결과 및 고찰

3-1. 총 Polyphenol 함량 측정

감태 추출물의 각 fraction에 함유된 총 polyphenol 함량을 tannic acid를 기준물질로 하여 측정하였다.

총 polyphenol의 함량이 *n*-BuOH, 85% aq. MeOH, H₂O, *n*-hexane fraction의 순서로 각각 68.78, 22.89, 3.86, 1.16 mg/ml로 나타났다 (Fig. 7.). 총 polyphenol의 함량이 가장 *n*-BuOH fraction에서 생리활성이 우수한 화합물이 함유되어 있을 것으로 기대된다.

Fig. 7. Contents of total polyphenol in each solvent fractions from *E. cava*.



3-2. 감태에서 분리된 화합물들의 구조결정

Compound 1은 하얀색의 powder 형태로 분리되었으며, 분자식 $C_6H_6O_3$ 는 질량 분석과 ^{13}C NMR 자료에 의해서 결정되었다. 대칭형의 1,3,5-trihydroxybenzene 구조를 가지고 있으며, hydroxy기에 의해 벤젠 고리의 1H NMR 스펙트럼 peak가 upfield로 이동하여 δ 5.77 ppm에서 나타났다. ^{13}C NMR에서의 두 개의 peak가 downfield로 이동한 δ 160.0 ppm 및 upfield로 이동한 δ 95.5 ppm에서 나타남으로써 산소가 벤젠의 1,3,5-위치에 결합되어 있음을 알 수 있었다.

Compound 2는 황백색의 powder 형태로 분리되었으며, 분자식 $C_{18}H_{14}O_9$ 은 질량 분석과 ^{13}C NMR 자료에 의해서 결정되었다. 1H NMR 스펙트럼의 δ 5.7 - 6.0 ppm에서 방향족 화합물에서 기인한 신호를 참고하고, ^{13}C NMR에서 14개의 peak가 관찰되는 것을 통해, 세 개의 벤젠 고리 중 두 개가 대칭으로 존재하고 있음을 알 수 있었고 이는 불포화도 값 ($U=12$)과 정확히 일치하였으며, 이들 벤젠고리는 compound 1 단량체들의 결합으로 예상할 수 있었다. 1H NMR 스펙트럼에서 AB_2 system signal [δ 6.00 (1H, d, 2.2), δ 5.92(1H, t, 2.2)]과 AB system signal [δ 6.04 (1H, d, 2.8), δ 5.75 (1H, d, 2.8)] 그리고 A_2 system [δ 5.89 (1H, s)]이 확인되었다. 또한 ^{13}C NMR 스펙트럼을 통해 각각의 벤젠고리는 ether 결합으로 연결되어 있음을 확인할 수 있었다. 추가적인 구조는 1H COSY, TOCSY, gHMQC, gHMBC와 같은 2D NMR 실험을 이용하여 결정하였다. 이는 이미 알려진 화합물인 Triphlorethol-A로서 문헌치의 NMR data와 비교 분석한 결과 잘 일치하였다 (Fukuyama et al., 1985).

Compound 3은 밝은 갈색의 powder형태로 분리되었으며, 분자식 $C_{18}H_{12}O_9$ 는 질량 분석과 ^{13}C NMR 자료에 의해서 결정되었으며, 불포화도는 13을 나타내었다. ^{13}C NMR 스펙트럼의 δ 160-100 부근에서 산소에서 기인된 aromatic carbon으로 예상되는 12개의 신호가 나타났으며, δ 100-90 부근에 치환되지 않은 5개의 peak(δ 99.69, δ 99.20, δ 97.54, δ 95.61, δ 95.20)가 확인되었다. 또한 1H NMR 스펙트럼에서도 3개의 aromatic proton의 특징적인

signal, 즉 의 AB₂ system에서 기인한 δ 5.92(1H, s) peak, AB system에서 기인한 δ 5.93(1H, s)peak와 singlet인 δ 6.12(1H, s)peak가 관찰 되었다. 이를 통해 compound **3**이 3개의 phloroglucinol 단위를 가지는 화합물임을 예상할 수 있었다. 또한 compound **3**은 ¹H NMR과 ¹³C NMR 스펙트럼이 compound **2**의 구조와 매우 유사한 양상을 나타내었는데 이를 비교하였을 때 ¹H NMR 스펙트럼에서 한 개의 방향족 수소(H-5, δ 6.04)와 ¹³C NMR에서 나타난 치환되지 않은 방향족 탄소(C-5, δ 94.8)가 사라지고, 산소가 치환된 새로운 방향족 탄소신호(C-5a, δ 147.05)가 나타남으로써, compound **3**에서의 open-chain결합이 연결되어져 aryl-ether 구조를 형성하는 것으로 확인되었으며, 전형적인 Dibenzo-*p*-dioxi 골격을 가지고 있는 화합물인 것을 확인 하였다. Compound **2**의 전체적인 구조는 ¹H COSY, TOCSY, NOESY, gHMQC, gHMBC 와 같은 2D NMR 실험을 이용하여 결정하였으며, 이미 알려진 화합물인 Eckol로써 문헌치의 NMR data와 비교 분석한 결과 잘 일치하였다 (Herron et al., 1986; Fukuyama et al., 1989).

Compound **4**는 황백색의 powder 형태로 분리되었으며, 분자식 C₁₈H₁₀O₉은 질량 분석과 ¹³C NMR 자료에 의해서 결정되었고 불포화도는 14로 나타났다. ¹³C NMR 스펙트럼의 δ 155 - 124 ppm 부근에서 13개의 산소가 결합된 aromatic carbon 이 나타났다. 그리고 ¹³C NMR 스펙트럼의 δ 100 - 95 ppm 부근에서 5개의 non-substituted carbon의 신호가 나타났다. 또한 ¹H NMR 스펙트럼의 δ 6.2 - 5.9 ppm 부근에서 aromatic proton에 기인한 5개의 peak가 나타났는데 이는 compound **3**와 유사한 양상의 NMR 스펙트럼으로 compound **4**가 dibenzo-*p*-dioxin의 기본골격을 이루고 있음을 나타내었다. ¹H NMR 스펙트럼에서 compound **3**과 비교하여 하나의 aromatic proton peak(H-2', δ 5.92)와 한 개의 non-substituted aromatic carbon peak(C-2', δ 95.18)가 사라졌으며, 산소가 치환된 새로운 aromatic carbon peak(C-8a, δ 124.73)가 나타남으로써 compound **4**가 C-8a와 C-7a 사이에 aryl-ether 결합이 추가된 구조임을 의미하였다. 이는 이미 알려진 화합물인 eckstolonol로서 문헌치의 NMR data와 비교

분석한 결과 잘 일치하였다 (Kang et al., 2003).

Compound 5는 밝은 갈색의 powder 형태로 분리되었으며, 분자식 $C_{30}H_{18}O_{14}$ 은 질량분석과 ^{13}C NMR 자료에 의해서 결정되었다. ^{13}C NMR 스펙트럼에 의해 30개의 aromatic carbons중 9개의 methine, 2개의 quaternary carbon과 산소에서 기인된 19개의 carbon peak와 2개의 quaternary carbon peak를 확인 할 수 있었다. 1H NMR spectrum에서는 2개의 AB_2 system peak [δ 5.96 (2H, d, 2), δ 5.91 (1H, t, 2)]와 [δ 5.93 (1H, t, 2.2), δ 5.87 (2H, d, 2.2)]이 존재하며, 3개의 singlet (δ 6.62, δ 6.39, δ 6.25)이 확인 되었다. 분자량과 NMR 스펙트럼 분석을 통해 5개의 phloroglucinol 단위로 이루어진 화합물임을 예측할 수 있었으며, dibenzo-*p*-dioxin 골격을 가지는 compound 2과 매우 유사한 화합물임을 확인하였다. ^{13}C NMR에서 dibenzo-*p*-dioxin 골격에서 나타나는 aryl ether 결합에 의한 carbon peak 이외의 aryl ether 결합에 의한 carbon peak인 C-12a(δ 152.97)와 C-11a(δ 150.96)가 추가적으로 나타났다. 그리고 quaternary carbon인 C-6(δ 105.17)과 C-7 (δ 105.22)의 chemical shift 값을 통해 C-6과 C-7이 aryl-aryl 결합을 통해서 연결됨을 추정할 수 있었다. Compound 5의 구조 결정은 추가적인 2D NMR 실험과 문헌 조사를 통해서 *Ecklonia Kurome*에서 분리되어진 phlorofucofuroeckol A임을 확인하였으며, 분광학적 데이터와 정확히 일치하였다 (Fukuyama et al., 1990; Sugiura et al., 2006).

Compound 6 역시 밝은 갈색의 powder 형태로 분리되었으며, 질량분석과 ^{13}C NMR 자료에 의해서 분자식 $C_{36}H_{22}O_{18}$ 으로 결정되었고 불포화도는 26으로 나타났다. Compound 6의 ^{13}C NMR spectrum의 양상이 Compound 3과 매우 유사한 형태로써 스펙트럼 상에서 각각의 peak들이 쌍을 이루어 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 두 개의 eckol 단위로 결합되어 있음을 추측하였다. 1H NMR에서 eckol의 H-4'(δ 5.92) peak와 쌍을 이루는 H-4'''의 proton peak가 사라졌으며, ^{13}C NMR 스펙트럼에서 C-4'(δ 97.53)와 쌍을 이루는 C-4''' (δ 126.26)는 전형적인 산소 치환된 aromatic carbon peak가 나타났다. 뿐만

아니라, C-7(δ 155.76, -OH)은 C-7''(δ 154.28, -O-R)과 chemical shift 값의 차이가 뚜렷하게 나타남으로써, 두 eckol group 간의 결합이 C-7과 C-4''' 사이에 aryl ether bond 연결되어져 있음을 확인할 수 있었다. 또한 C-1'''(δ 157.57)와 C-3'''(δ 152.16)의 각각의 chemical shift 값도 C-1'(δ 161.57)과 C-3'(δ 159.81)보다 up field로 이동됐다. 이러한 점들로 미루어 보았을 때 compound **6**은 Compound **2**의 dimer라고 추측 할 수 있으며, ^1H NMR spectrum에서 강한 singlet peak인 H-2',6' (δ 5.92)와 서로 쌍을 이루어 나타나는 peak인 H-2''', 6'''(δ 6.08)의 down field로의 화학적 이동은 eckol의 dimer 형태를 더욱 확실히 해주었다. 전체적인 구조는 2D 실험을 통해 규명되었으며 문헌조사를 통해 compound **6**은 감태에서 분리된 화합물인 dieckol이라는 사실을 확인 할 수 있었고 보고된 분광학적 데이터와 정확히 일치하였다 (Lee et al., 2009).



Table 3. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 2

position	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}
1	–	125.4 s
2	–	152.3 s
3	5.75 (1H, d, 2.8)	97.8 d
4	–	155.9 s
5	6.04 (1H, d, 2.8)	94.8 d
6	–	153.5 s
1'	–	162.1 s
2'	6.00 (1H, d, 2.2)	95.2 d
3'	–	160.0 s
4'	5.92 (1H, t, 2.2)	97.3 d
5'	–	160.0 s
6'	6.00 (1H, d, 2.2)	95.2 d
1''	–	124.4 s
2''	–	151.9 s
3''	5.89 (1H, s)	96.0 d
4''	–	156.1 s
5''	5.89 (1H, s)	96.0 d
6''	–	151.9 s

Measured in CD_3OD at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table 4. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 3

position	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}
1		125.35 s
2		146.99 s
3	6.12 (1H, s)	99.16 d
4		143.09 s
4a		124.27 s
5		
5a		143.97 s
6	5.93 (1H, s)	95.60 d
7		154.22 s
8	5.93 (1H, s)	99.66 d
9		146.83 s
9a		124.61 s
10		
10a		138.30 s
1'		161.60 s
2'	5.92 (1H, s)	95.18 d
3'		159.88 s
4'	5.92 (1H, s)	97.51 d
5'		159.88 s
6'	5.92 (1H, s)	95.18 d

Measured in CD_3OD at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, DEPT, gHMBC, and gHMBC experiments.

Table 5. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 4

position	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}
1	–	146.95 s
2	6.00 (H, d, 2.8)	99.87 d
3	–	154.45 s
4	5.97 (H, d, 2.5)	95.69 d
4a	–	143.52 s
5a	–	127.66 s
6	–	141.08 s
7	6.13 (H, s)	98.84 d
7a	–	138.97 s
8a	–	124.73 s
9	–	146.74 s
10	5.99 (H, d, 2.8)	99.75 d
11	–	154.09 s
12	5.94 (H, d, 2.5)	95.58 d
12a	–	143.26 s
13a	–	124.63 s
13b	–	132.85 s
14a	–	124.32 s

Measured in CD_3OD at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table 6. ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data for compound 5

position	δ_{H} (H, m., Hz)	δ_{C}
1		124.56 s
2		148.09 s
3	6.25 (1H, s)	99.25 d
4		143.73 s
4a		124.86 s
5		
5a		135.15 s
6		105.17 s
7		105.22 s
8		148.03 d
9	6.39 (1H, s)	99.85 s
10		151.51 s
11		122.19 s
11a		150.96 s
12		
12a		152.97 s
13	6.62 (1H, s)	96.11 d
14		145.76 s
14a		127.90 s
15		
15a		138.20 s
1'		161.66 s
2'	5.96 (2H, d, 2.0)	95.31 d
3'		159.96 s
4'	5.91 (1H, t, 2.0)	97.53 d
5'		159.96 s
6'	5.96 (2H, d, 2.0)	95.31 d
1''		161.63 s
2''	5.87 (2H, d, 2.2)	95.27 d
3''		159.98 s
4''	5.93 (1H, t, 2.2)	97.65 d
5''		159.98 s
6''	5.87 (2H, d, 2.2)	95.27 d

Measured in CD_3OD at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

Table 7. ^1H NMR spectral data for compound 6

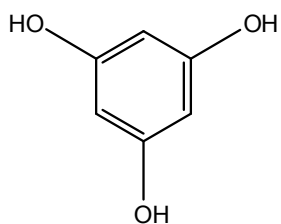
position	δ_{H} (H, m., Hz)	position	δ_{H} (H, m., Hz)
1		1''	
2		2''	
3	6.12 (1H, s)	3''	6.14 (1H, s)
4		4''	
4a		4a''	
5a		5a''	
6	5.94 (1H, d, 2.8)	6''	60.5 (1H, d, 3.0)
7		7''	
8	6.06 (1H, d, 2.8)	8''	5.97 (1H, d, 2.8)
9		9''	
9a		9a''	
10a		10a''	
1'		1'''	
2'	5.92 (3H, s)	2'''	6.08 (2H, s)
3'		3'''	
4'	5.92 (3H, s)	4'''	
5'		5'''	
6'	5.92 (3H, s)	6'''	6.08 (2H, s)

Measured in CD_3OD and CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.

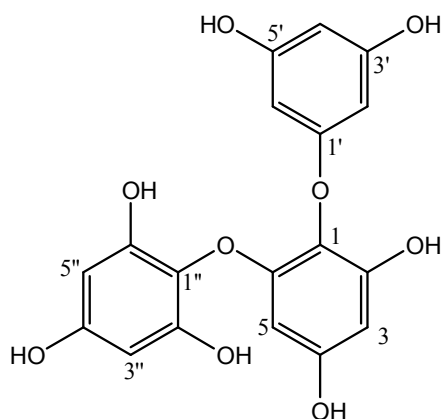
Table 8. ^{13}C NMR spectral data for compound 6

position	δ_{c}	position	δ_{c}
1	124.38 s	1''	124.44 s
2	147.11 s	2''	146.69 s
3	99.59 d	3''	99.34 d
4	143.08 s	4''	143.18 s
4a	125.46 s	4a''	125.40 s
5a	143.93 s	5a''	144.08 s
6	95.23 d	6''	95.71 d
7	155.76 s	7''	154.28 s
8	99.23 d	8''	99.73 d
9	146.90 s	9''	147.07 s
9a	126.00 s	9a''	124.68 s
10a	138.44 s	10a''	138.26 s
1'	161.57 s	1'''	157.57 s
2'	95.64 d	2'''	96.08 d
3'	159.81 s	3'''	152.16 s
4'	97.53 d	4'''	126.26 s
5'	159.81 s	5'''	152.16 s
6'	95.64 d	6'''	96.08 d

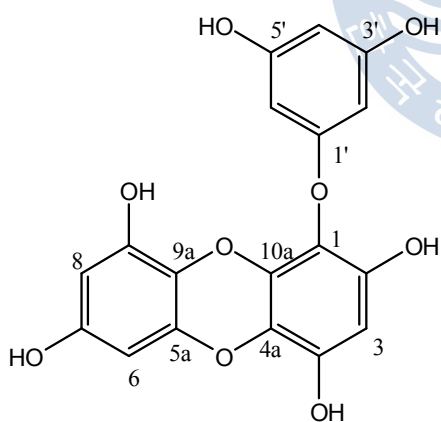
Measured in CD_3OD and CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H gDQCOSY, TOCSY, DEPT, gHMQC, and gHMBC experiments.



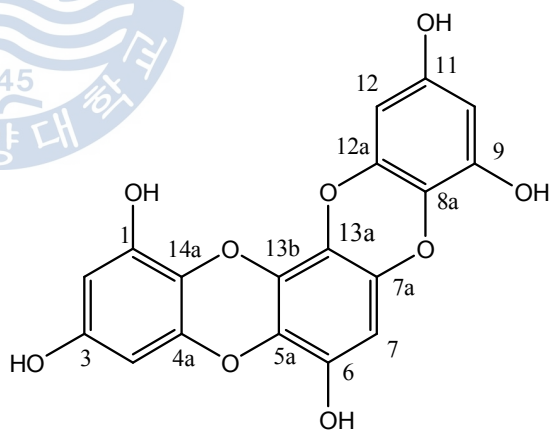
Compound 1
Phloroglucinol



Compound 2
Triphlorethol-A

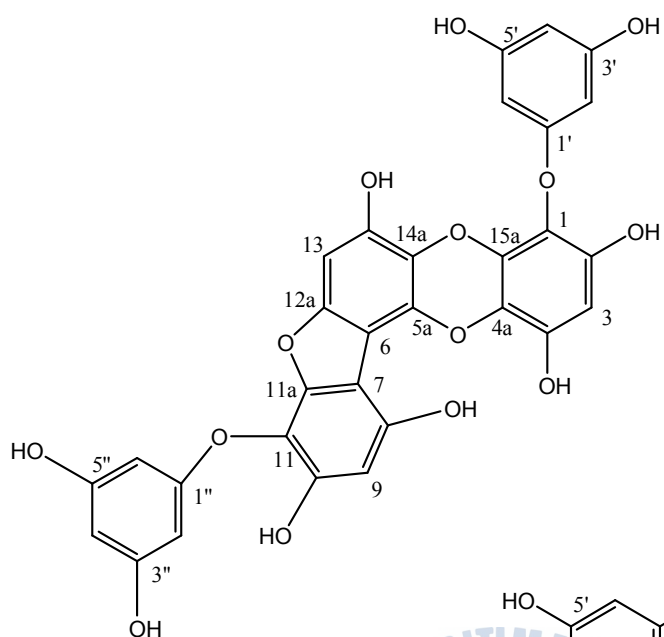


Compound 3
Eckol

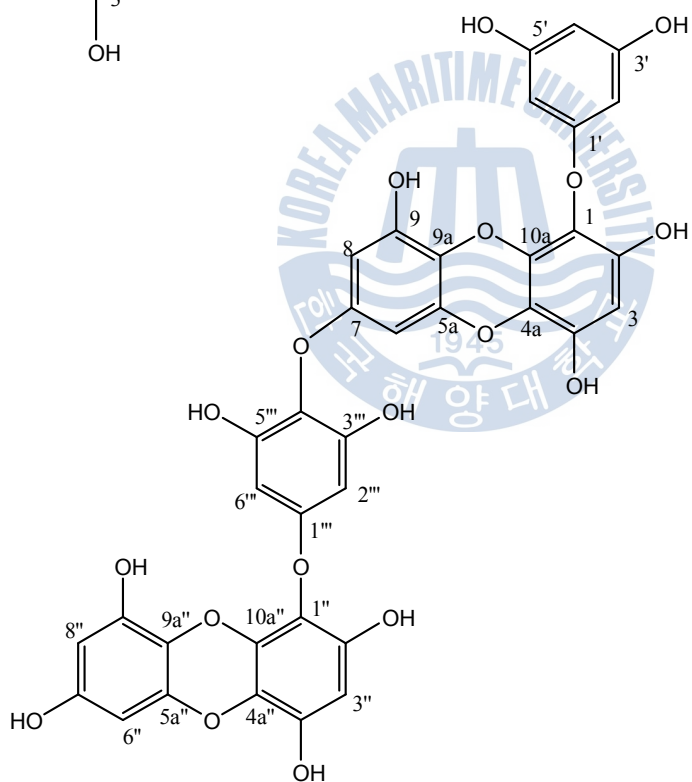


Compound 4
Eckstolonol

Fig. 8. Chemical structure of compounds 1-4 from *E. cava*.



Compound 5
Phlorofucofuroeckol A



Compound 6
Dieckol

Fig. 9. Chemical structure of compounds 5, 6 from *E. cava*.

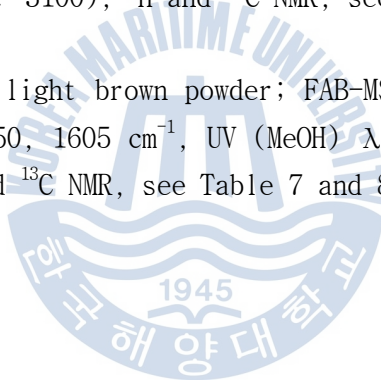
Compound **2** (Triphlorethol A) : light brown powder; FAB-MS m/z 374 $[M]^+$, $C_{18}H_{14}O_9$, IR (KBr) : $\nu_{\max}=3245, 1615\text{ cm}^{-1}$; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 3.

Compound **3** (Eckol) : light brown powder; FAB-MS m/z 372 $[M]^+$, $C_{18}H_{12}O_9$, IR (KBr) $\nu_{\max}\text{ cm}^{-1}$; 3250, 1605, cm^{-1} ; UV (MeOH) $\lambda_{\max}\text{ nm}$: 230 (ϵ 32000), 290 (ϵ 3100) nm ; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 4.

Compound **4** (Eckstolonol) : off-white powder; FAB-MS m/z 370 $[M]^+$, $C_{18}H_{10}O_9$, IR (KBr) : $\nu_{\max}=3243, 1635, 1518, 1494, 1396, 1281, 1243, 1207, 1154, 1118, 1089, 1012, 810\text{ cm}^{-1}$; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 5.

Compound **5** (Phlorofucofuroeckol A) : light brown powder; FAB-MS m/z 603 $[M]^+$, $C_{30}H_{18}O_{14}$, IR (KBr) $\nu_{\max}\text{ cm}^{-1}$; 3350, 3300, 1605, 1470, 1360, 1110, 1060, 880 cm^{-1} ; UV (MeOH) $\lambda_{\max}\text{ nm}$: 224 (sh), 224 (ϵ 58000), 292 (ϵ 6800), 304 (sh), 317 (ϵ 3100), ^1H and ^{13}C NMR, see Table 6.

Compound **6** (Dieckol) : light brown powder; FAB-MS m/z 743 $[M]^+$, $C_{36}H_{22}O_{18}$, IR (KBr) $\nu_{\max}\text{ cm}^{-1}$; 3250, 1605 cm^{-1} , UV (MeOH) $\lambda_{\max}\text{ nm}$: 235 (ϵ 34000), 292 (ϵ 3500) nm, ^1H and ^{13}C NMR, see Table 7 and 8, respectively.



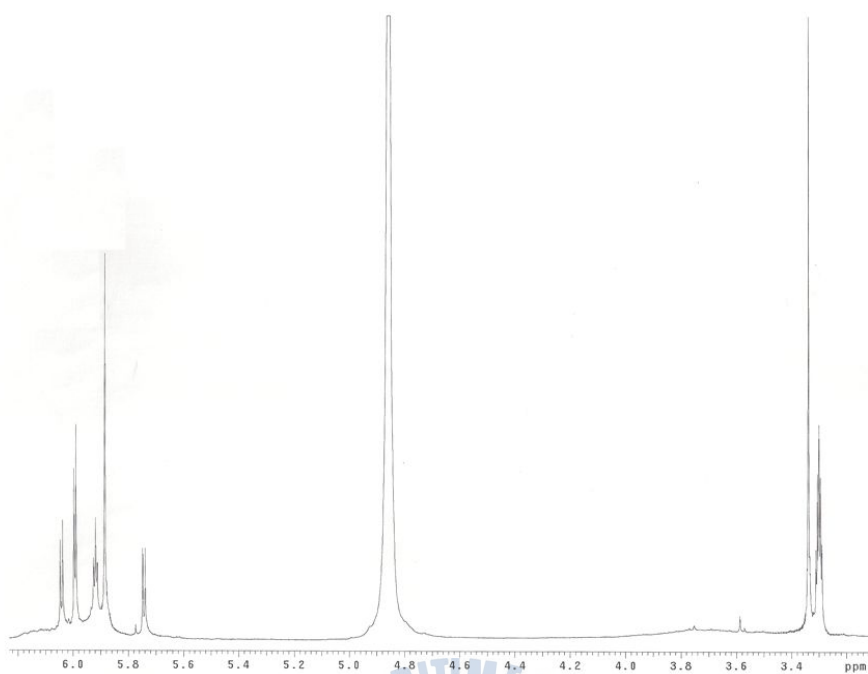


Fig. 10. ^1H NMR spectrum of compound 2 in CD_3OD .

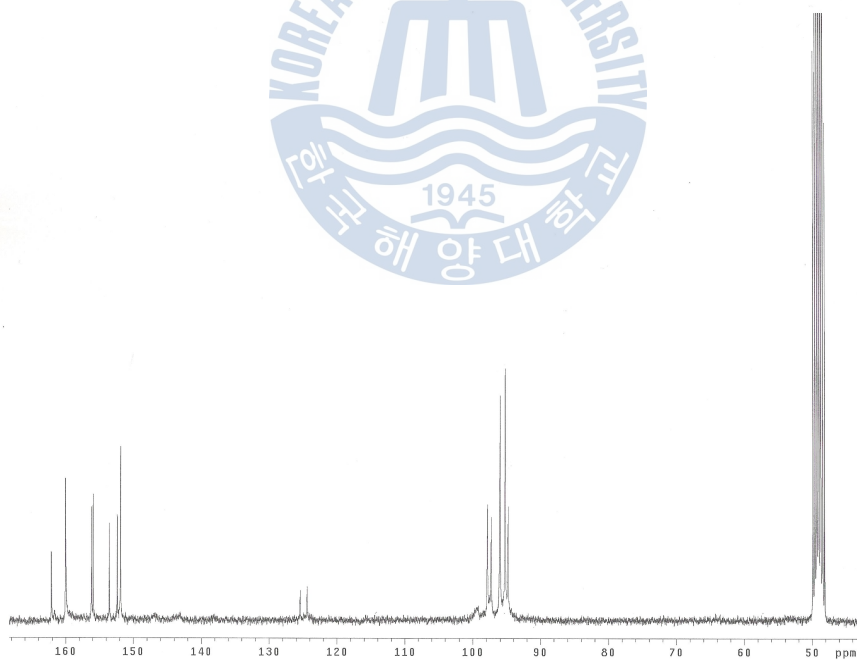


Fig. 11. ^{13}C NMR spectrum of compound 2 in CD_3OD .

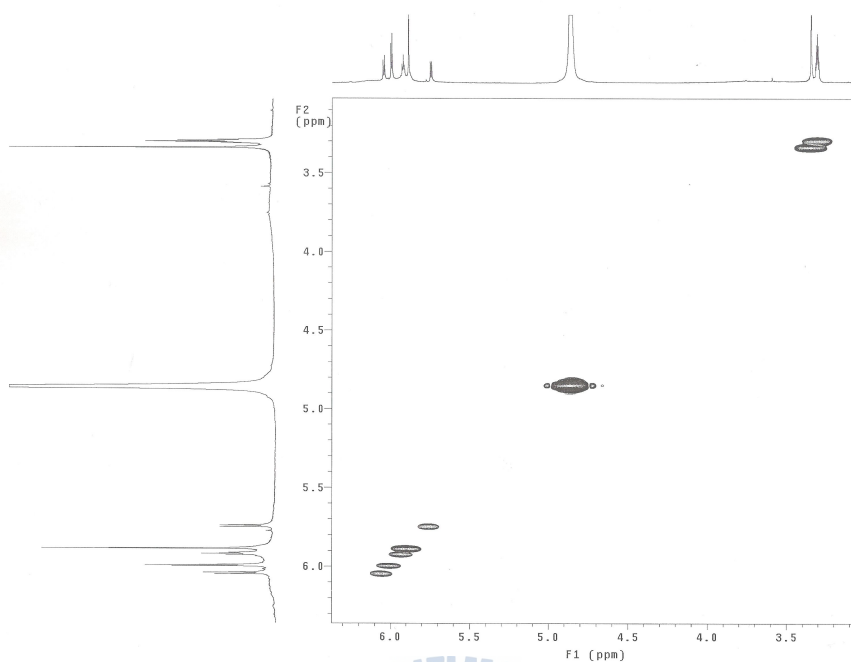


Fig. 12. gDQCOSY spectrum of compound 2 in CD₃OD.

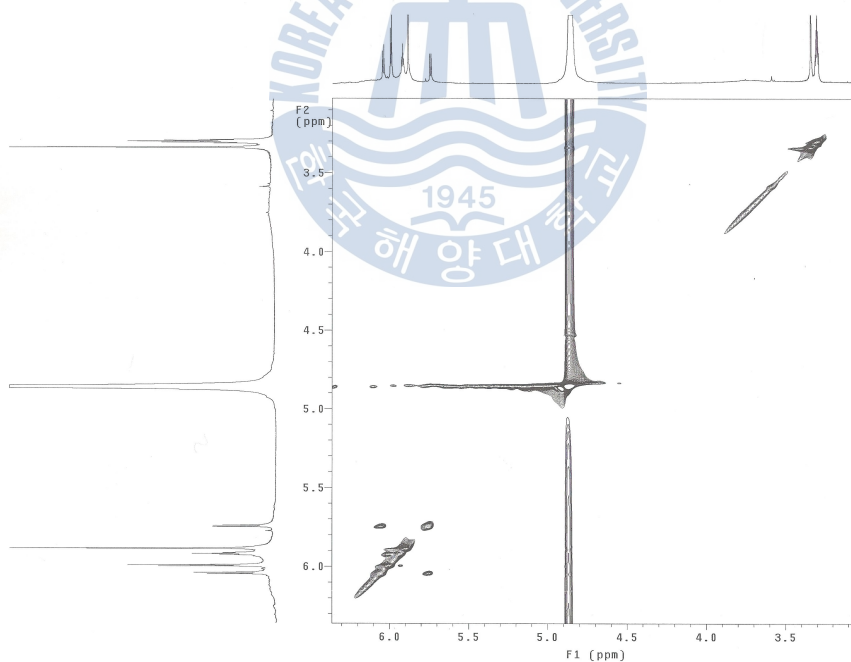


Fig. 13. TOCSY spectrum of compound 2 in CD₃OD.

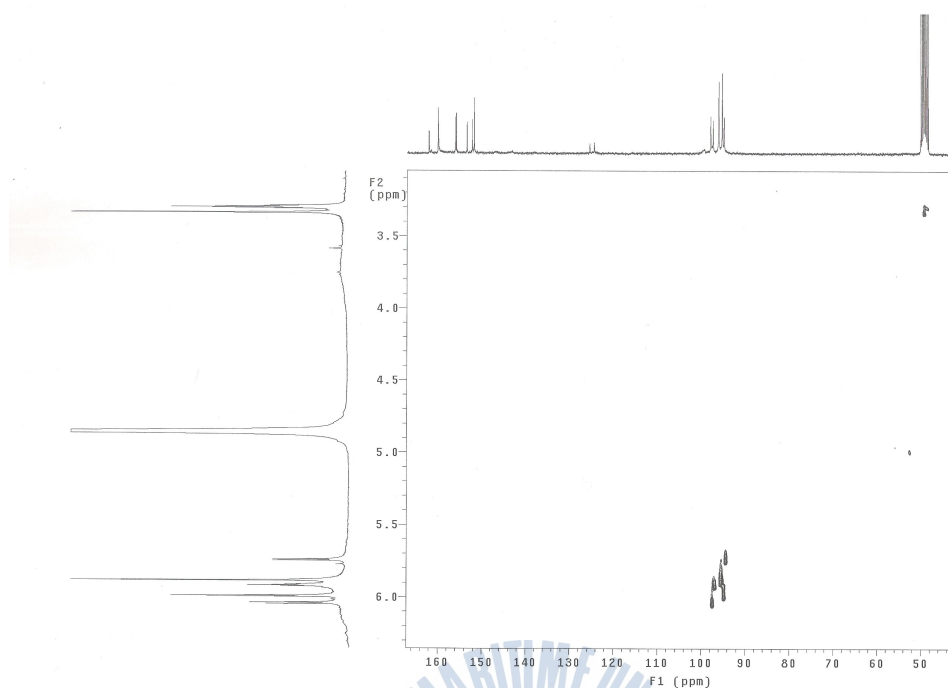


Fig. 14. gHMQC spectrum of compound 2 in CD₃OD

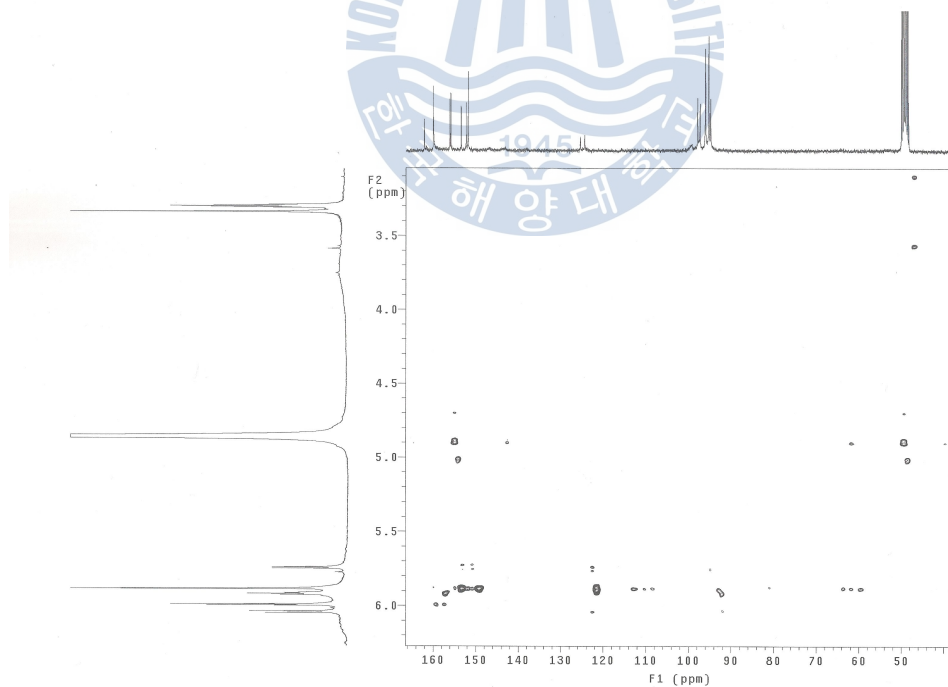


Fig. 15. gHMBC spectrum of compound 2 in CD₃OD

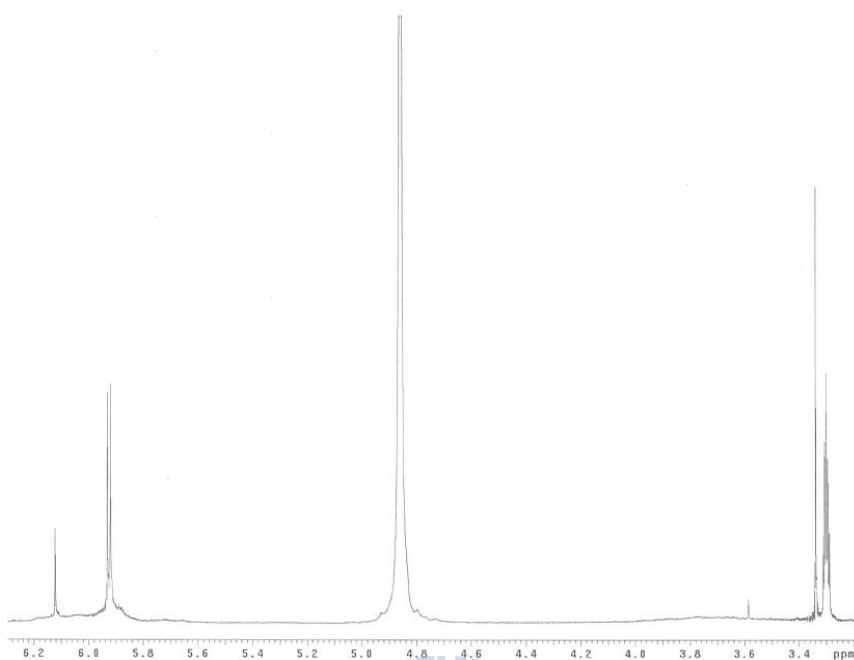


Fig. 16. ^1H NMR spectrum of compound 3 in CD_3OD .

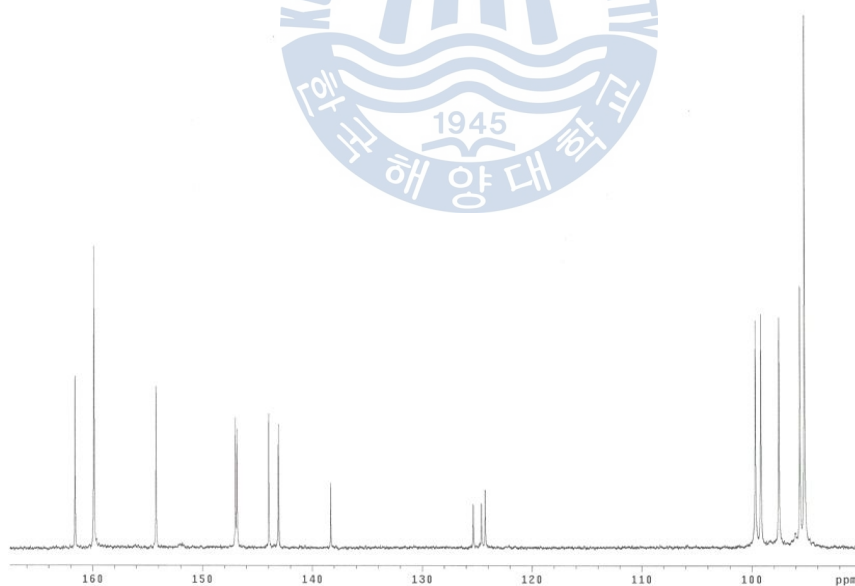


Fig. 17. ^{13}C NMR spectrum of compound 3 in CD_3OD .

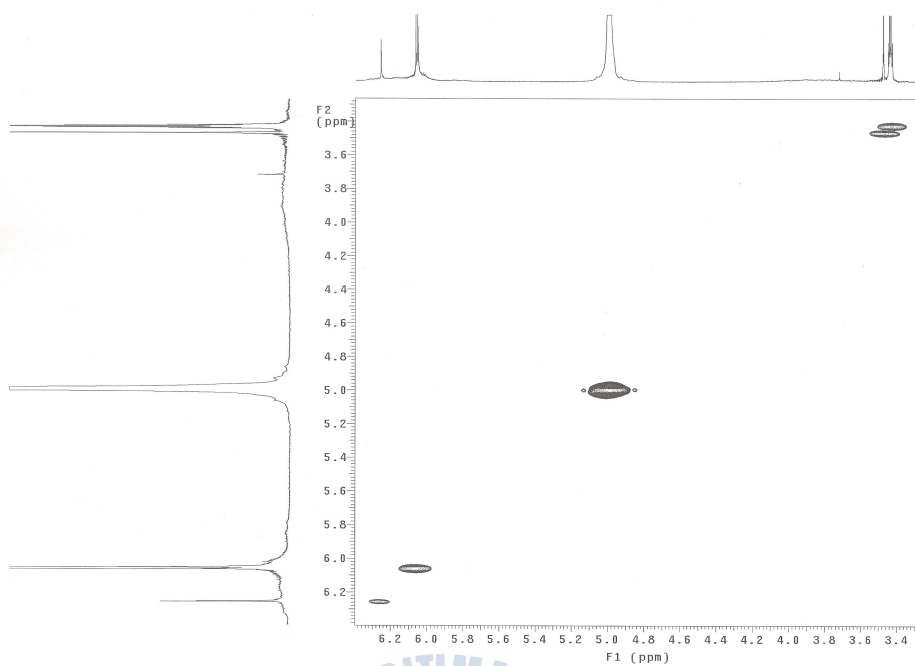


Fig. 18. gDQCOSY spectrum of compound 3 in CD_3OD .

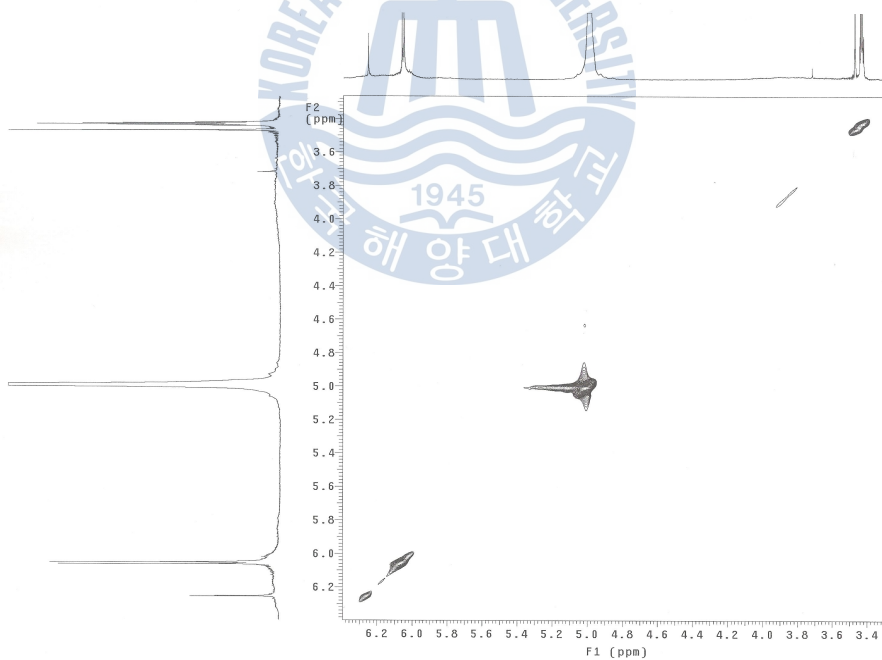


Fig. 19. TOCSY spectrum of compound 3 in CD_3OD .

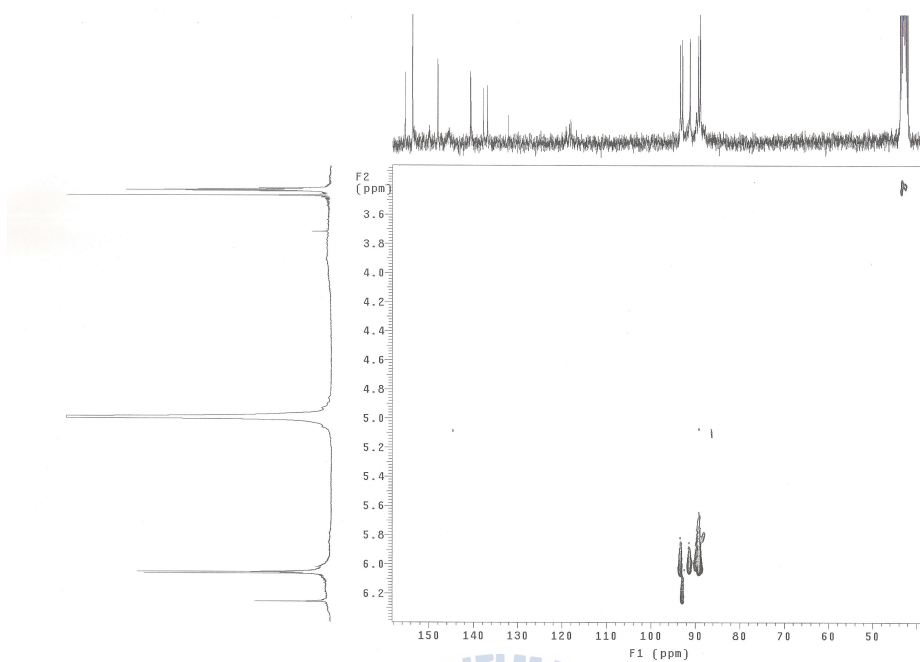


Fig. 20. gHMQC spectrum of compound 3 in CD_3OD .

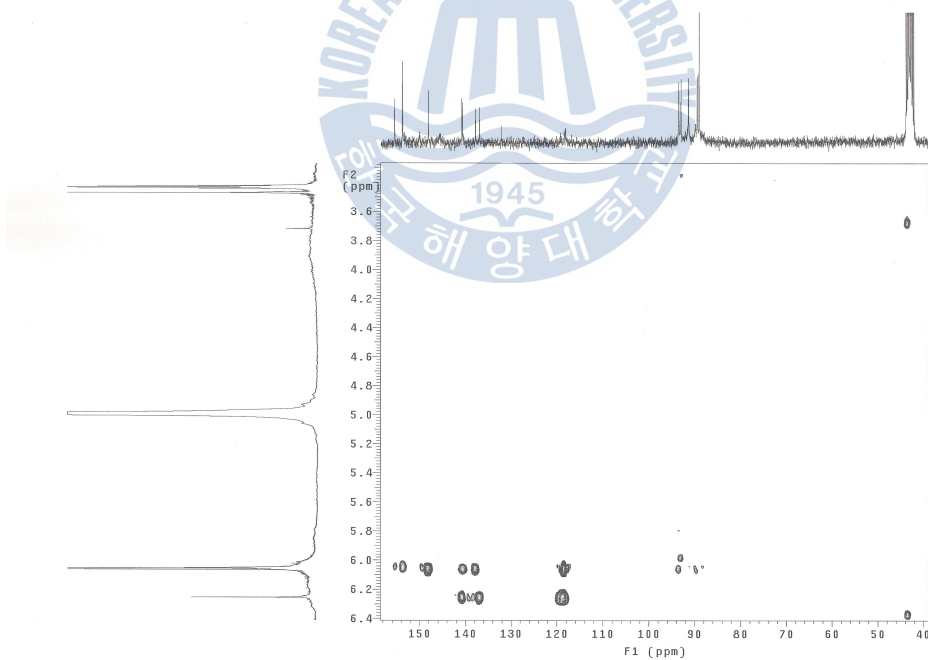


Fig. 21. gHMBC spectrum of compound 3 in CD_3OD .

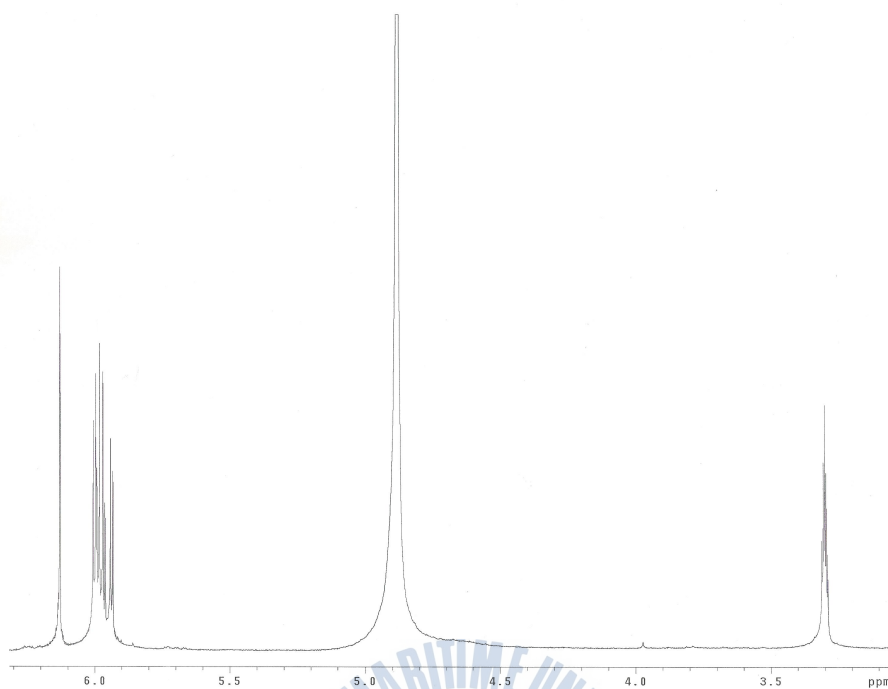


Fig. 22. ^1H NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD .

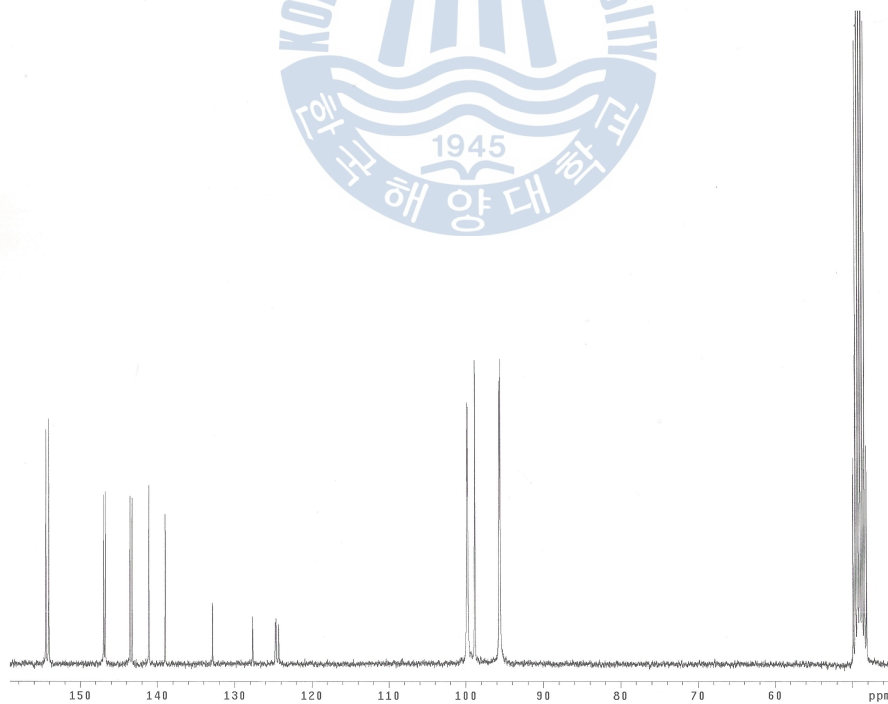


Fig. 23. ^{13}C NMR spectrum of compound 4 in CD_3OD .

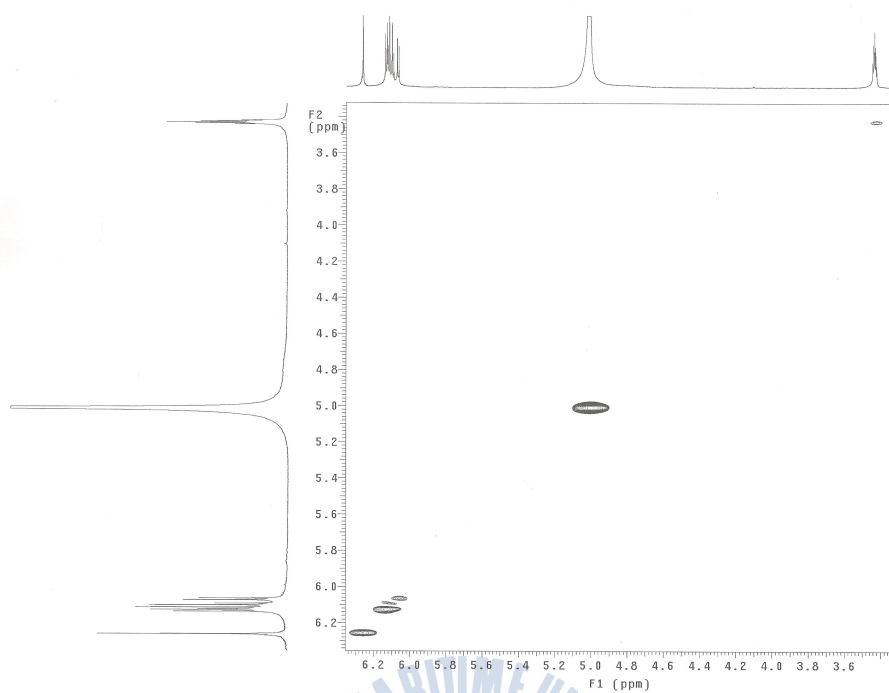


Fig. 24. gDQCOSY spectrum of compound 4 in CD₃OD.

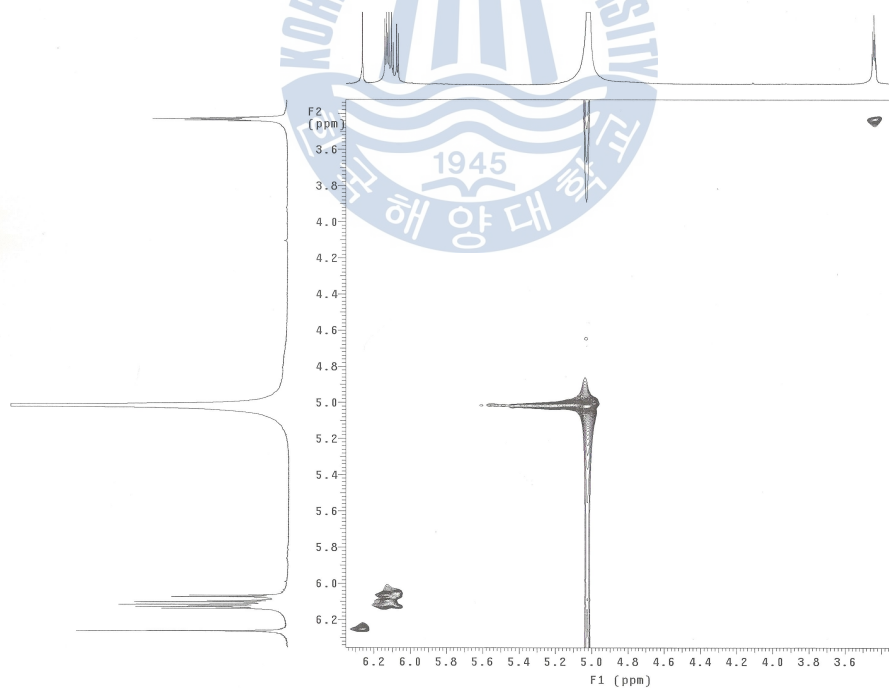


Fig. 25. TOCSY spectrum of compound 4 in CD₃OD.

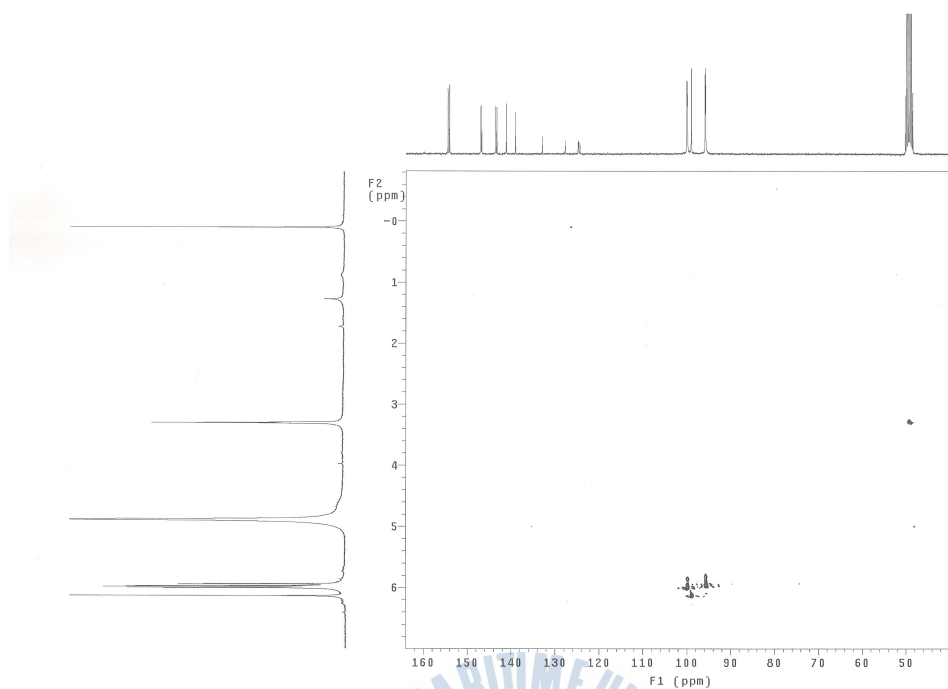


Fig. 26. gHMQC spectrum of compound 4 in CD₃OD.

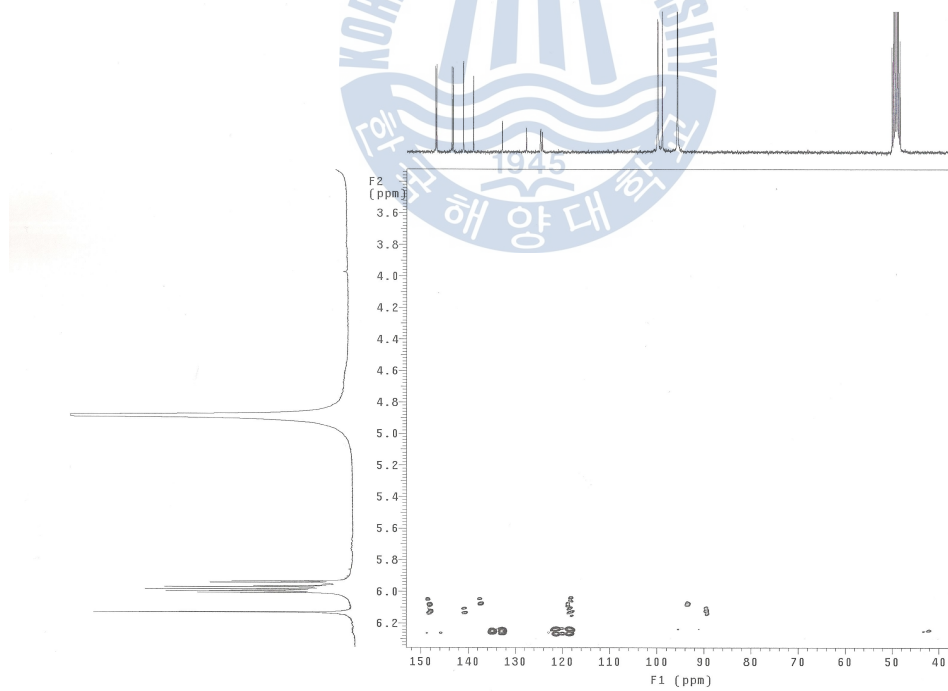


Fig. 27. gHMBC spectrum of compound 4 in CD₃OD.

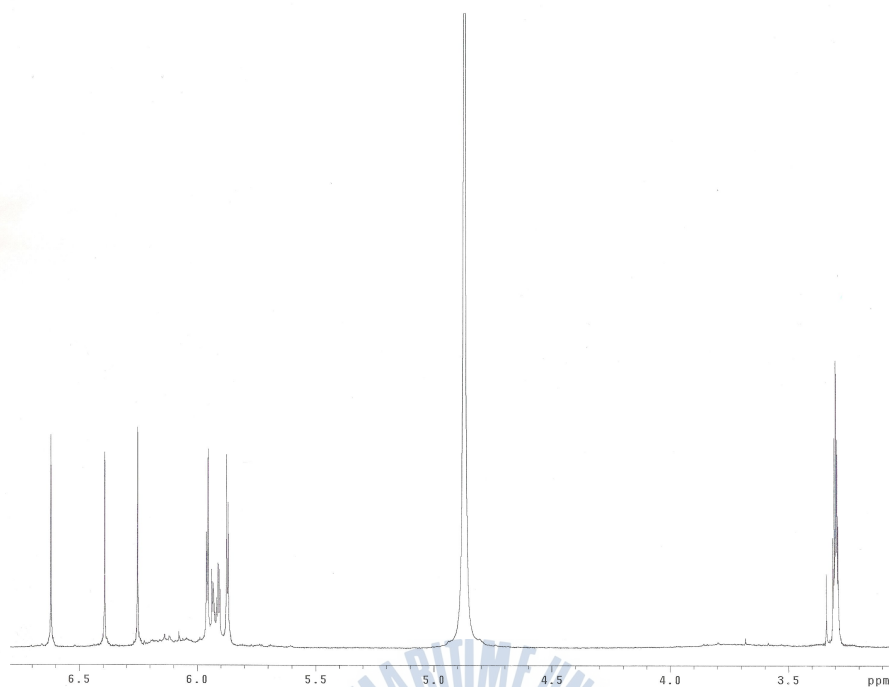


Fig. 28. ^1H NMR spectrum of compound 5 in CD_3OD .

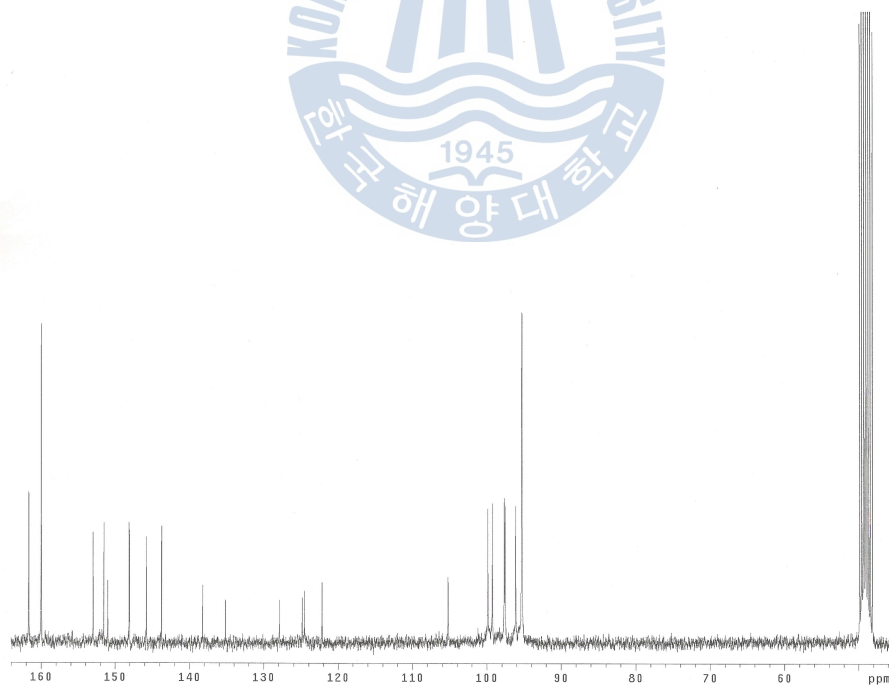


Fig. 29. ^{13}C NMR spectrum of compound 5 in CD_3OD .

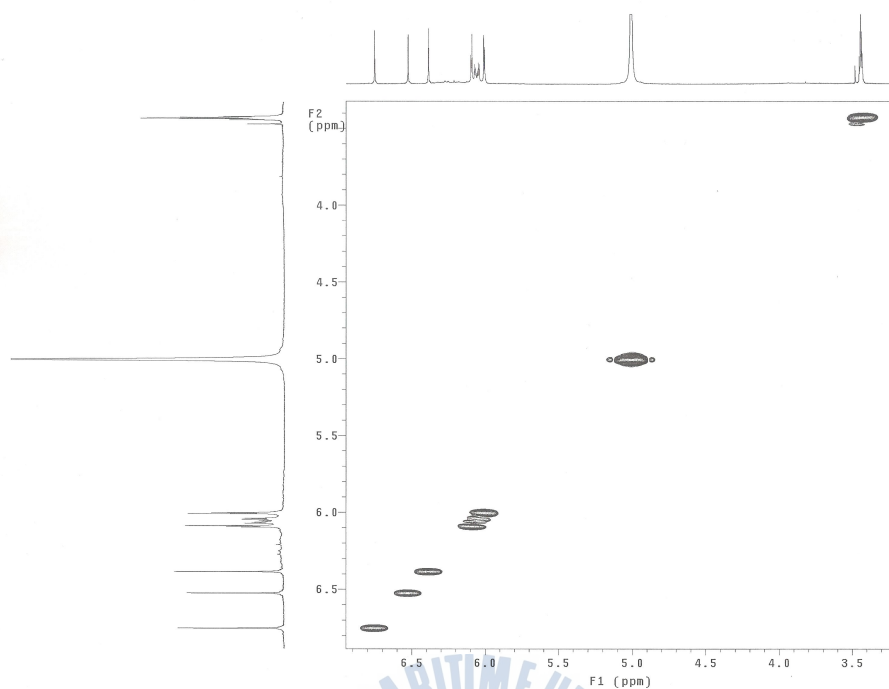


Fig. 30. gDQCOSY spectrum of compound 5 in CD₃OD.

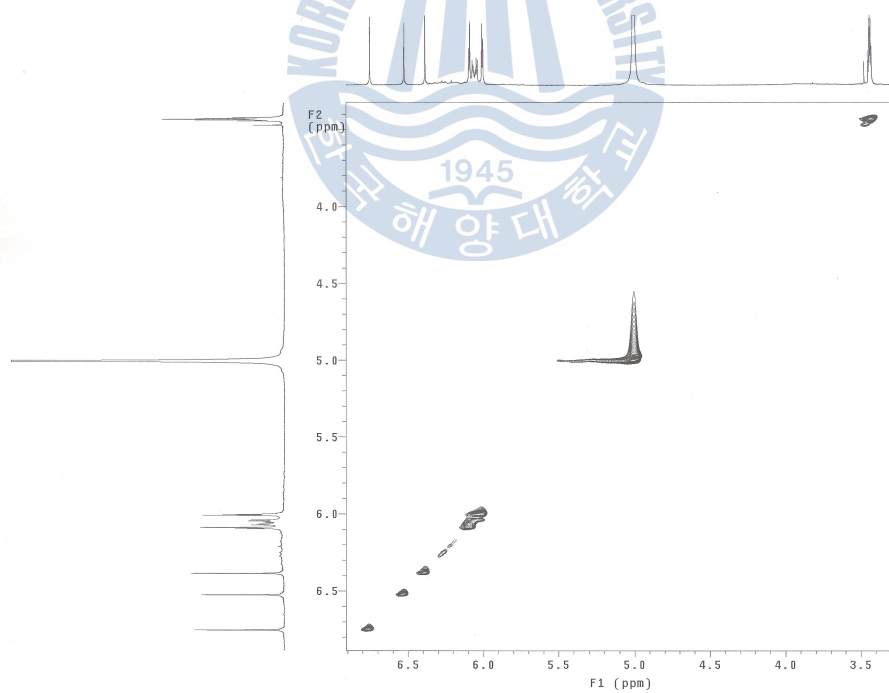


Fig. 31. TOCSY spectrum of compound 5 in CD₃OD.

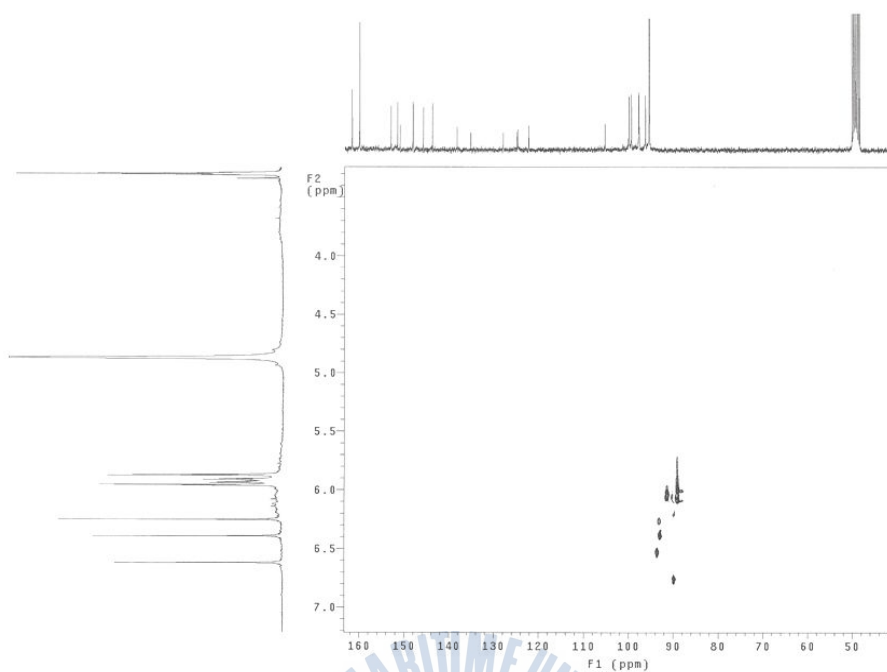


Fig. 32. gHMQC spectrum of compound 5 in CD₃OD.

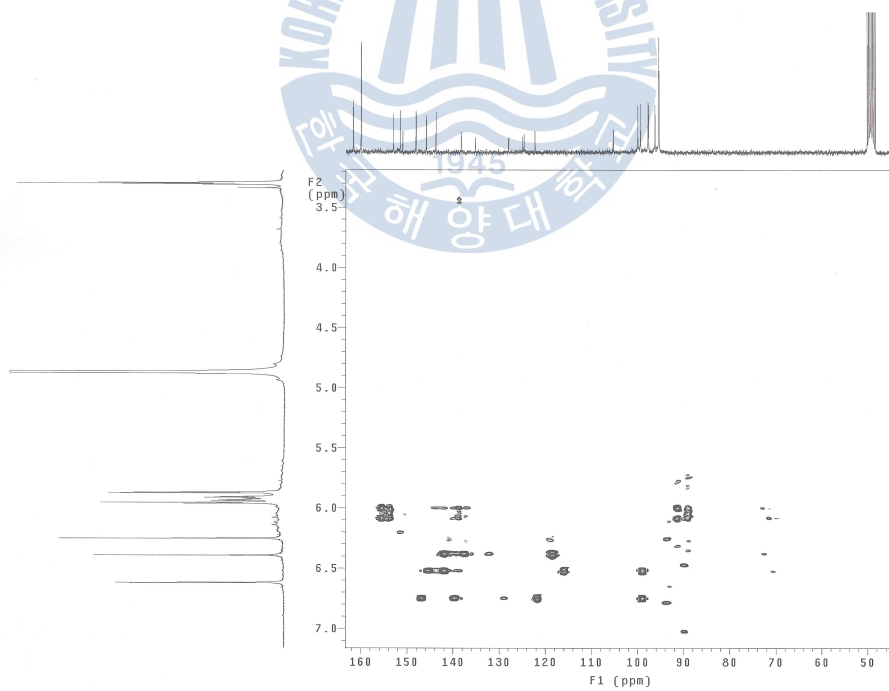


Fig. 33. gHMBC spectrum of compound 5 in CD₃OD

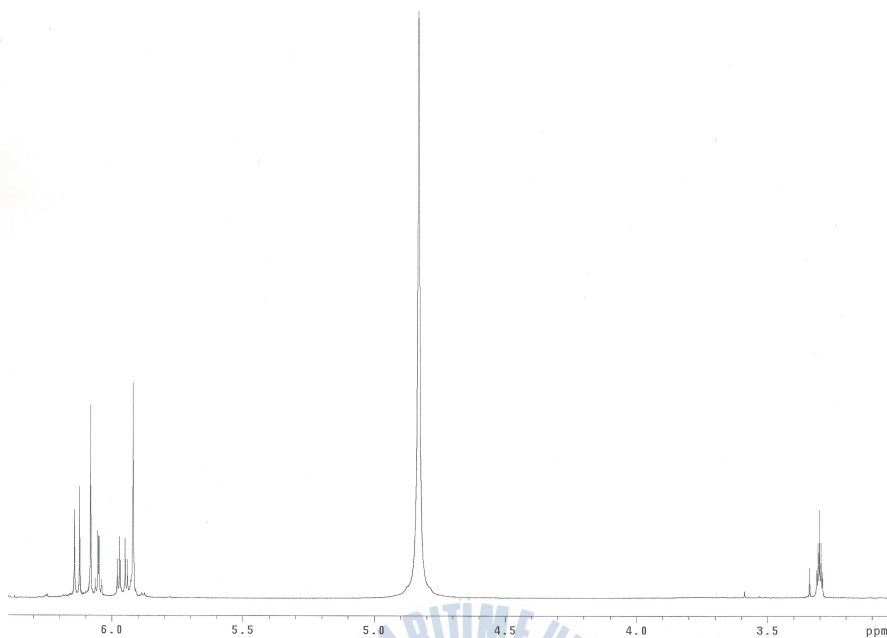


Fig. 34. ^1H NMR spectrum of compound 6 in CD_3OD .

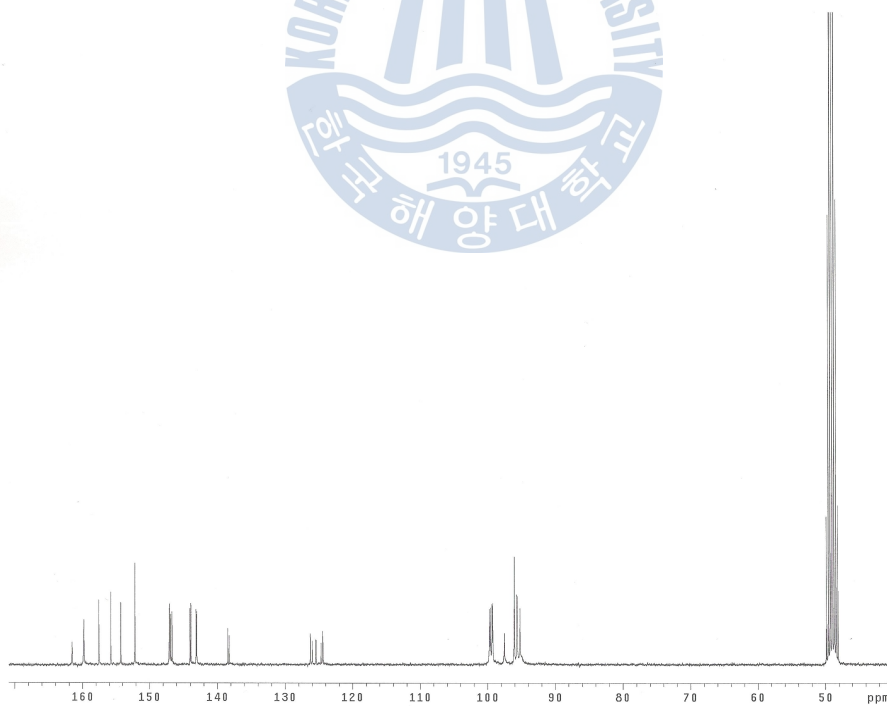


Fig. 35. ^{13}C NMR spectrum of compound 6 in CD_3OD .

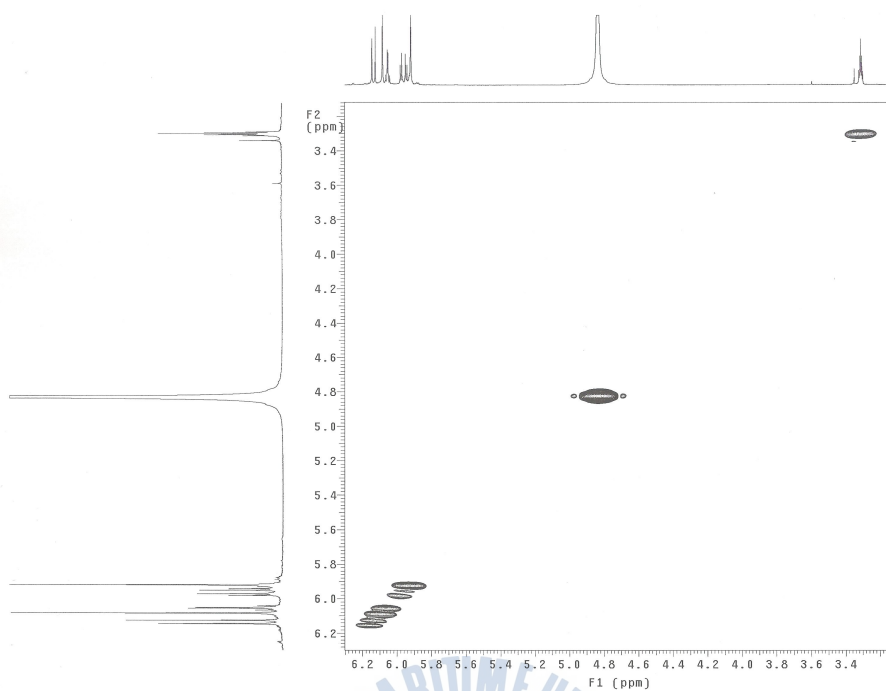


Fig. 36. gDQCOSY spectrum of compound 6 in CD₃OD

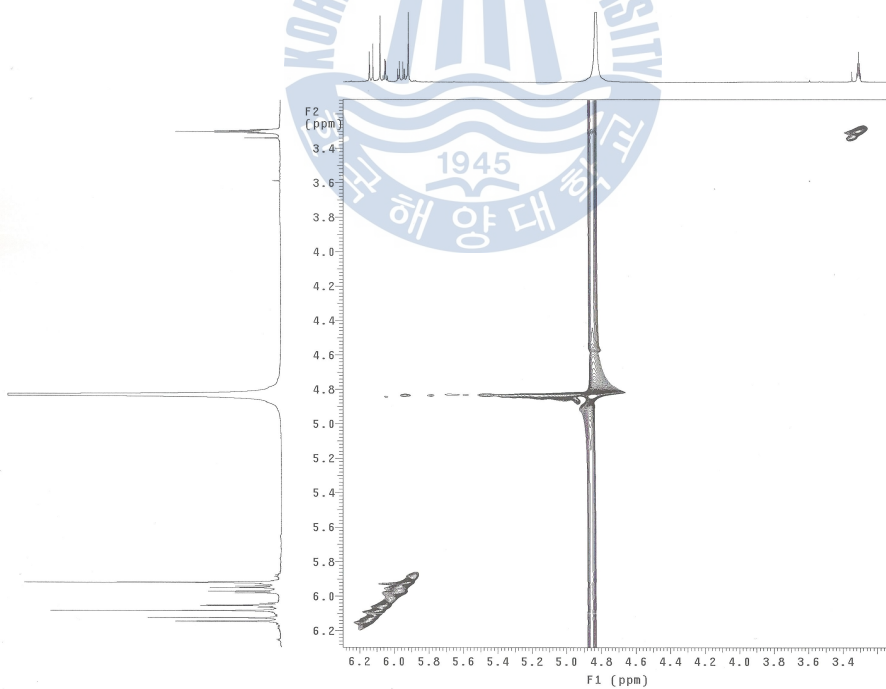


Fig. 37. TOCSY spectrum of compound 6 in CD₃OD

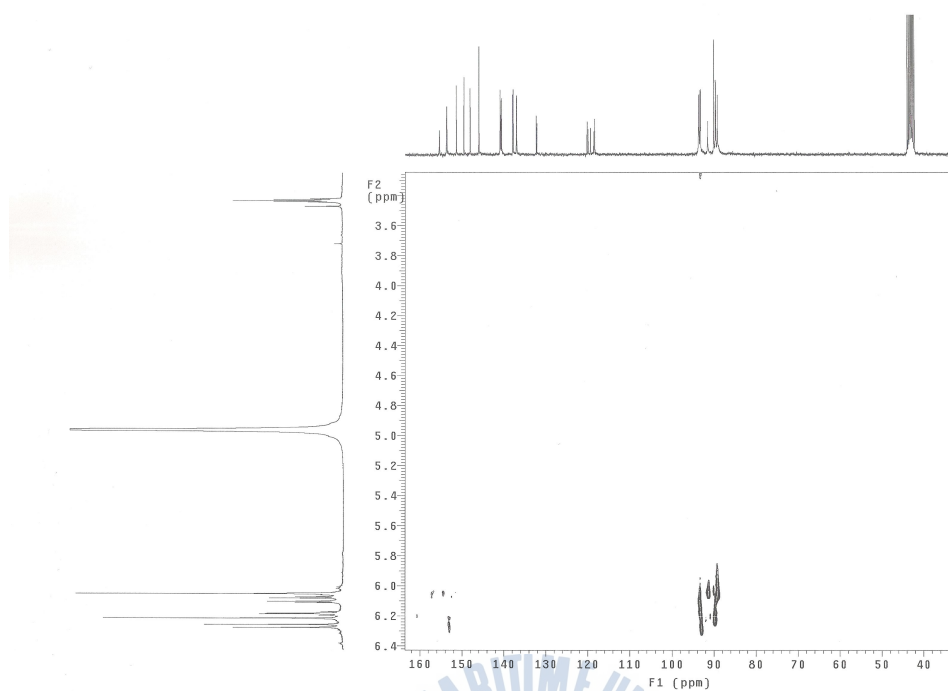


Fig. 38. gHMQC spectrum of compound 6 in CD₃OD

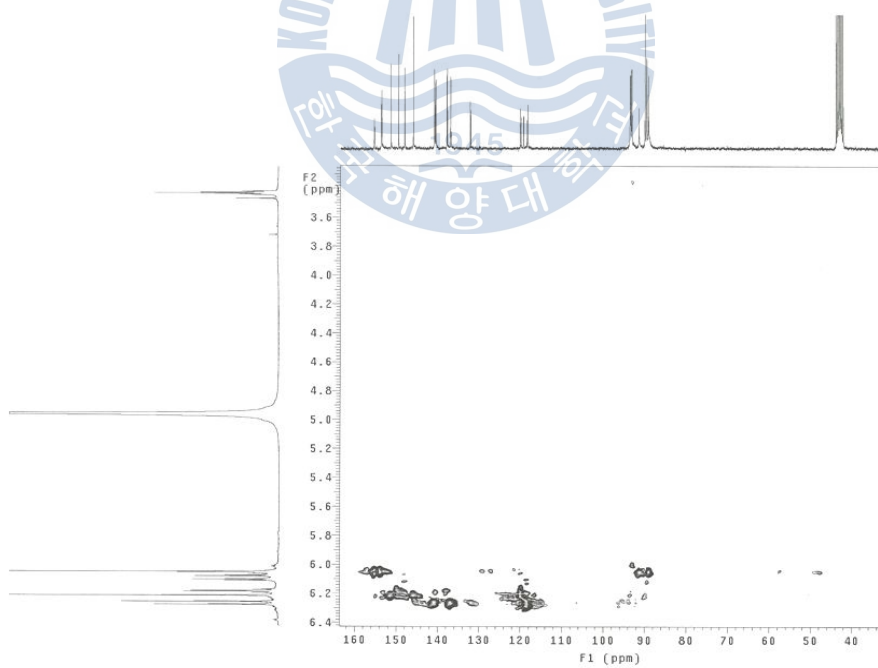


Fig. 39 gHMBC spectrum of compound 6 in CD₃OD

3-3. *In vitro* 항산화 활성

(1) DPPH radical 소거 활성

감태를 끓는점까지 가열한 methanol 용매로 추출하여 극성에 따라 *n*-hexane, 85% aq.MeOH, *n*-BuOH, H₂O의 순으로 순차적으로 분획하였다. 얻어진 fractions을 각각 50, 10, 5, 1, 0.1 µg/mL 농도에서 DPPH radical 소거 활성을 검색하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid와 BHT (butylated hydroxy toluene)를 사용하였다.

검색결과, 50 µg/mL 에서 대조군 L-ascorbic acid는 96.41% 의 소거 효과를 보였으며, BHT는 78.67 % 의 소거 효과를 나타내었다. 이와 비교 하여 조추출물인 MeOH extract(54.05%)는 높은 효과를 나타내지 않았지만, 조추출물을 유기용매로 분획한 fractions중에서 일부는 비교적 높은 DPPH radical 소거 활성 효과를 나타내었다. 특히, 4개의 용매 fractions 중에서 *n*-BuOH fraction은 91.69 %로 가장 높은 radical 소거 활성 효과를 나타내었는데, 이는 대조군인 L-ascorbic acid와 거의 유사한 수준이었으며, 또 다른 대조군으로써 식품 등에 주로 첨가되어 산패방지제로 사용되는 BHT보다 오히려 더 높은 수준의 radical 소거 활성을 나타내었다 (Table 9).

DPPH radical 소거 활성 측정에 사용된 조추출물 및 용매분획 시료는 정제되지 않은 상태이며, 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid와 BHT의 항산화 활성을 고려하였을 때, *n*-BuOH fraction에 항산화 효과가 매우 뛰어난 물질이 존재할 것으로 예상된다.

Table 9. DPPH radical scavenging effect of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* (EDA(%))

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)				
	50	10	5	1	0.1
MeOH ext.	54.05	24.82	16.21	11.59	9.85
<i>n</i> -hexane fr.	73.64	38.05	27.59	14.46	11.18
85% aq. MeOH fr.	71.79	36.62	26.67	13.85	11.18
<i>n</i> -BuOH fr.	91.69	60.72	46.67	22.46	12.51
H ₂ O fr.	16.21	12.82	12.51	11.79	11.59
BHA	78.67	60.31	40.62	15.69	6.87
L-ascorbic acid	96.41	96.21	96.00	61.74	6.15



(2) Peroxynitrite 소거 활성

DHR 123은 세포내 ONOO^- 와 반응하여 형광성 물질인 rhodamine 123으로 바뀌게 되므로 이 생성물의 흡광도를 측정함으로써 감태의 ONOO^- 소거 활성을 검토할 수 있다. ONOO^- 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 control과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

조추출물과 이를 분획하여 얻어진 4개의 fractions인 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H_2O 분획물에 대하여 각각 100, 50, 10, 5, 1, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 SIN-1 과 authentic peroxynitrite에 대한 소거 활성을 검색하였다. 대조군으로 L-ascorbic acid와 penicillamine을 사용하였다.

먼저 SIN-1을 처리한 결과 100, 50, 10, 5, 1, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군 L-ascorbic acid는 99.78%, 99.82%, 99.40%, 99.20%, 95.15%, 66.33%를 보였으며, penicillamine은 103.99%, 101.41%, 99.95%, 92.39%, 64.88%, 27.78%를 나타내었다. 조추출물과 분획물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군과 비교할 때 모두 높은 소거 활성을 나타내었으며, 특히 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 *n*-BuOH과 85% aq. MeOH 그리고 *n*-hexane fractions은 각각 79.05%, 71.85%, 76.56%로 대조군인 penicillamine보다 더 높은 활성을 나타내었으며, 이들 중에서 *n*-BuOH fractions은 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서도 대조군인 L-ascorbic acid와 비교할 수 있을 정도의 높은 활성을 보여주었다(Table 10.).

Authentic peroxynitrite에 대한 소거 활성을 측정한 결과 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid와 penicillamine은 100, 50, 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 100%에 해당하는 소거 활성을 나타내었으나, 활성이 줄어드는 농도인 5 $\mu\text{g/mL}$ 부터는 전반적으로 SIN-1의 항산화 활성 측정 결과 보다 낮게 나온 것을 확인 할 수 있었다. 조추출물과 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H_2O fraction에 대한 소거 활성을 각각 측정한 결과 H_2O fraction을 제외한 모두가 높은 활성을 나타냈으며, 특히 *n*-BuOH fraction은 농도 의존적으로 대조군인 penicillamine에 상응하는 우수한 활성 효과를 보였다(Table 11). 이러한 결과를 통해 *n*-BuOH

fraction을 더 정제 분리 할 경우 높은 소거활성을 가지는 화합물을 얻을 수 있을 것으로 예상 된다.



Table 10. Scavenging effect of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on ONOO⁻ from SIN-1 (% of control)

Sample	Concentration (μg/mL)					
	100	50	10	5	1	0.1
MeOH ext.	103.12 ± 1.31	95.20 ± 2.50	94.17 ± 0.07	82.30 ± 2.19	57.16 ± 1.79	13.47 ± 1.33
<i>n</i> -hexane fr.	95.40 ± 0.18	101.07 ± 1.47	92.21 ± 0.13	92.18 ± 0.39	76.56 ± 0.65	28.26 ± 1.90
85% aq. MeOH fr.	95.30 ± 1.16	92.14 ± 1.63	88.24 ± 3.12	88.06 ± 4.57	71.85 ± 0.54	28.50 ± 1.25
<i>n</i> -BuOH fr.	103.94 ± 20.52	104.26 ± 2.04	92.43 ± 3.75	87.64 ± 1.74	79.05 ± 0.63	42.63 ± 3.19
H ₂ O fr.	84.72 ± 1.11	74.68 ± 2.75	47.14 ± 2.80	21.44 ± 2.61	13.05 ± 2.53	1.87 ± 1.54
L-ascorbic acid	99.78 ± 0.74	99.82 ± 0.64	99.40 ± 1.23	99.20 ± 0.46	95.15 ± 0.04	66.33 ± 1.67
Penicillamine	103.99 ± 0.40	101.41 ± 0.31	99.95 ± 0.21	92.39 ± 1.60	64.88 ± 0.30	27.78 ± 0.79

Each data is represented as the mean ± SD of two experiments.

Table 11. Scavenging effect of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on authentic ONOO⁻ (% of control)

Sample	Concentration (μg/mL)					
	100	50	10	5	1	0.1
MeOH ext.	98.61 ± 0.12	97.36 ± 0.02	85.35 ± 0.13	71.69 ± 0.48	26.64 ± 0.06	1.99 ± 3.44
<i>n</i> -hexane fr.	99.89 ± 0.23	98.97 ± 0.12	93.85 ± 0.08	84.56 ± 0.36	42.68 ± 0.85	12.79 ± 1.06
85% aq. MeOH fr.	97.89 ± 1.25	97.28 ± 0.22	90.66 ± 0.25	82.24 ± 0.48	39.99 ± 0.05	2.88 ± 0.31
<i>n</i> -BuOH fr.	92.34 ± 0.30	92.51 ± 0.45	91.19 ± 0.23	89.57 ± 0.32	67.50 ± 1.70	15.77 ± 1.32
H ₂ O fr.	62.01 ± 0.49	51.69 ± 0.57	18.59 ± 0.28	1.19 ± 0.34	0.16 ± 0.32	-2.56 ± 0.01
L-ascorbic acid	100.12 ± 0.01	100.40 ± 0.09	100.16 ± 0.03	98.64 ± 0.02	84.95 ± 0.21	-0.09 ± 0.15
Penicillamine	98.58 ± 0.25	99.14 ± 0.18	92.51 ± 0.27	86.65 ± 0.14	64.04 ± 0.53	28.41 ± 1.78

Each data is represented as the mean ± SD of two experiments.

3-3. 세포 수준에서의 항산화 활성

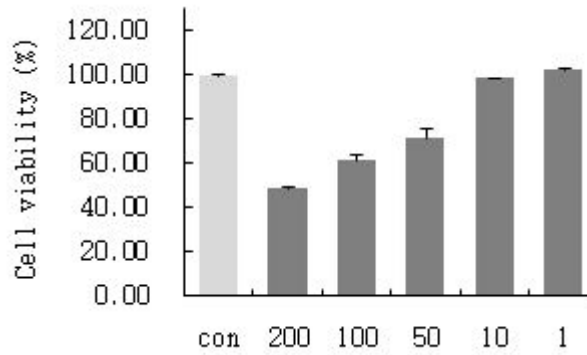
(1) Raw 264.7 cell에 대한 조추출물과 용매분획물의 MTT assay 효과

감태 조추출물과 용매분획물의 항산화 활성 측정을 위해서 MTT assay를 이용하여 sample이 Raw 264.7과 HT1080 세포 각각의 viability에 미치는 영향을 확인하였다. 모든 sample의 농도는 200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였다.

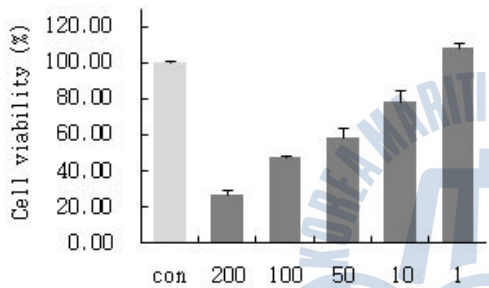
Raw 264.7 cell에 대한 cell viability는 *n*-BuOH과 H₂O fraction의 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 대조군과 비교하여 90%이상의 cell viability를 보였으며, 85% aq. MeOH은 50 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도에서 세포 생존에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 조추출물과 *n*-hexane fraction에서는 10 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 세포 생존을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 40.).

MTT assay를 측정하여 얻어진 cell viability의 측정결과를 바탕으로 Raw cell에 대하여 ROS, NO contents 및 iNOS mRNA 발현을 확인하였다.

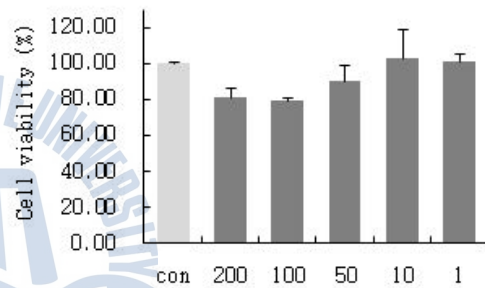




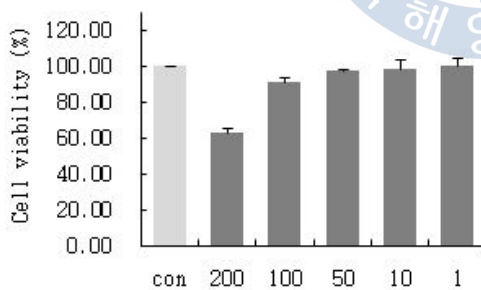
(a) MeOH ext.



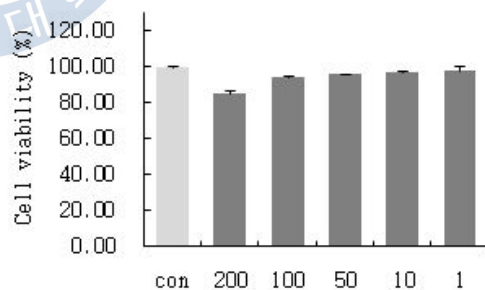
(b) *n*-hexane fr.



(c) 85% aq. MeOH fr.



(d) *n*-BuOH fr.



(e) H₂O fr.

Fig. 40. Effect of crude extract and solvent fractions from *E. cava* on viability of Raw 264.7 cell.

(2) 조추출물과 용매분획물의 ROS (total free radical 측정) 소거 활성

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 DCFH-DA를 사용해 세포내 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. 500 μM 의 H_2O_2 로 처리한 후 0분부터 30분 간격으로 120분 동안 측정하여 감태의 활성을 검색하였다. 모든 sample은 각각 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 측정하였으며, 대조군으로는 sample을 넣지 않고 500 μM H_2O_2 로 처리한 control과 sample과 500 μM H_2O_2 를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하였다. 500 μM H_2O_2 를 처리한 control은 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 급격히 증가하였으며, 500 μM H_2O_2 를 처리하지 않은 blank는 시간에 따른 DCF fluorescence 값의 변화가 거의 없었다. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 H_2O fractions를 제외한 모든 sample이 측정한 두 시간 동안 500 μM H_2O_2 로 처리하지 않은 blank와 비슷한 양상을 보이는 높은 활성을 나타내었으며, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 에서도 control에 비교하였을 때 생성된 유리라디칼을 현저하게 소거하였다. 이것으로 보아 측정한 모든 농도에서 감태 추출물이 세포내 ROS 소거 활성에 매우 뛰어난 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 41, 42).

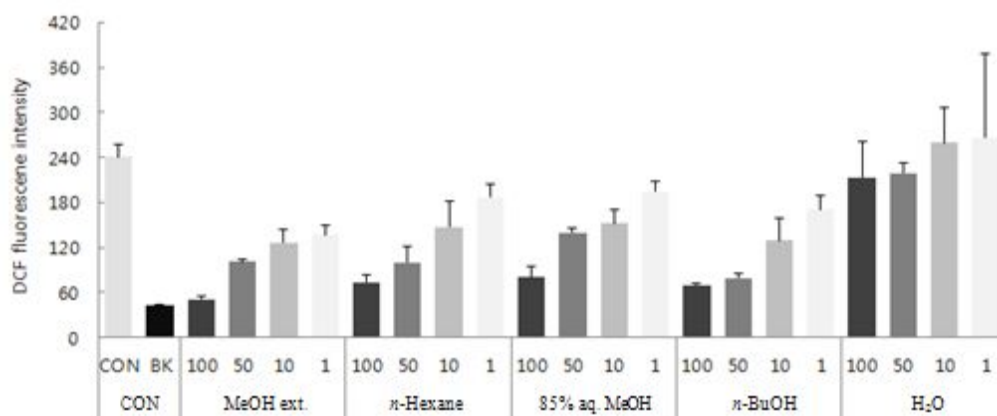
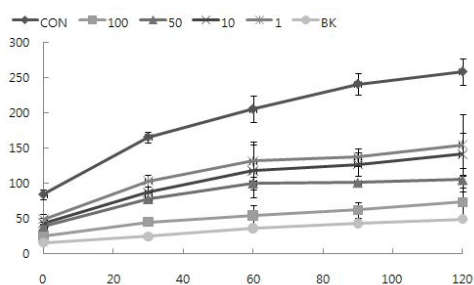
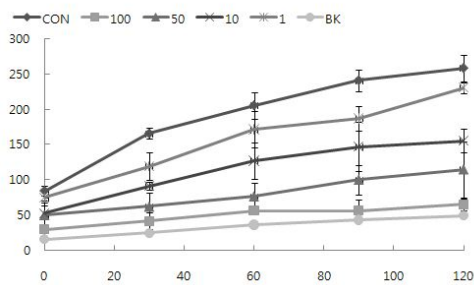


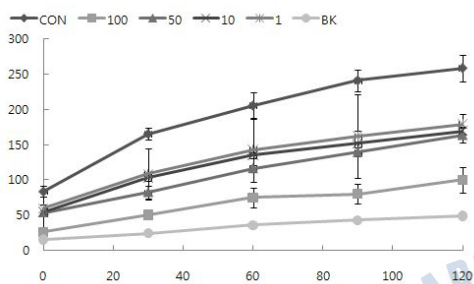
Fig. 41. Effects of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in Raw 264.7 cells. The cell were incubated with different concentration (100, 50, 10 and 1 $\mu\text{g/mL}$) of the sample for 90 min.



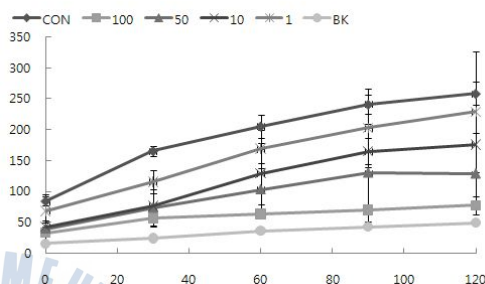
(a) MeOH ext.



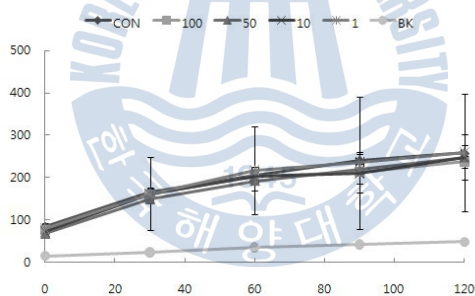
(b) *n*-hexane fr.



(c) 85% aq. MeOH fr.



(d) *n*-BuOH fr.



(e) H₂O fr.

Fig. 42. Effects of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on intracellular ROS levels induced by hydrogen peroxide in Raw 264.7 cells. The cell were incubated with different concentration (100, 50, 10 and 1 $\mu\text{g/mL}$) of the sample for the indicated times respectively.

3-4. 항염증 활성

(1) NO 생성 억제 효과

NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트룰린과 NO로 변하는데, 이는 빠른 속도로 안정화된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. Griess 시약은 아질산염과 화학반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 이 아조염의 농도로부터 아질산염의 흡광도를 측정하여 540 nm에서 측정하였다. 모든 sample은 각각 100, 50, 10, 1 µg/mL의 농도로 측정하였으며, 대조군으로는 sample을 넣지 않고 1 µg/mL LPS로 처리한 control과 sample과 LPS 모두 다 처리하지 않은 blank를 사용하였다. NO의 생성을 측정한 결과 LPS로 자극한 control과 비교하였을 때, 폴리페놀 함량이 높은 *n*-BuOH fraction에서 농도 의존적으로 NO생성이 감소함을 확인할 수 있었다. 특히, 100 µg/mL의 농도에서는 LPS로 자극하지 않은 blank와 거의 동일한 값을 나타내는 우수한 결과를 보여주었다. 그리고 세포 독성을 보이지 않았던 85% aq. MeOH fraction의 50 µg/mL 이하의 농도에서도 농도 의존적으로 NO 생성이 감소되었다. 조추출물에서 나타난 NO 생성 억제 효과는 세포 독성에 기인한 결과로 사료되며, *n*-Hexane과 H₂O fraction에서는 NO 생성을 효과적으로 억제하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 43.).

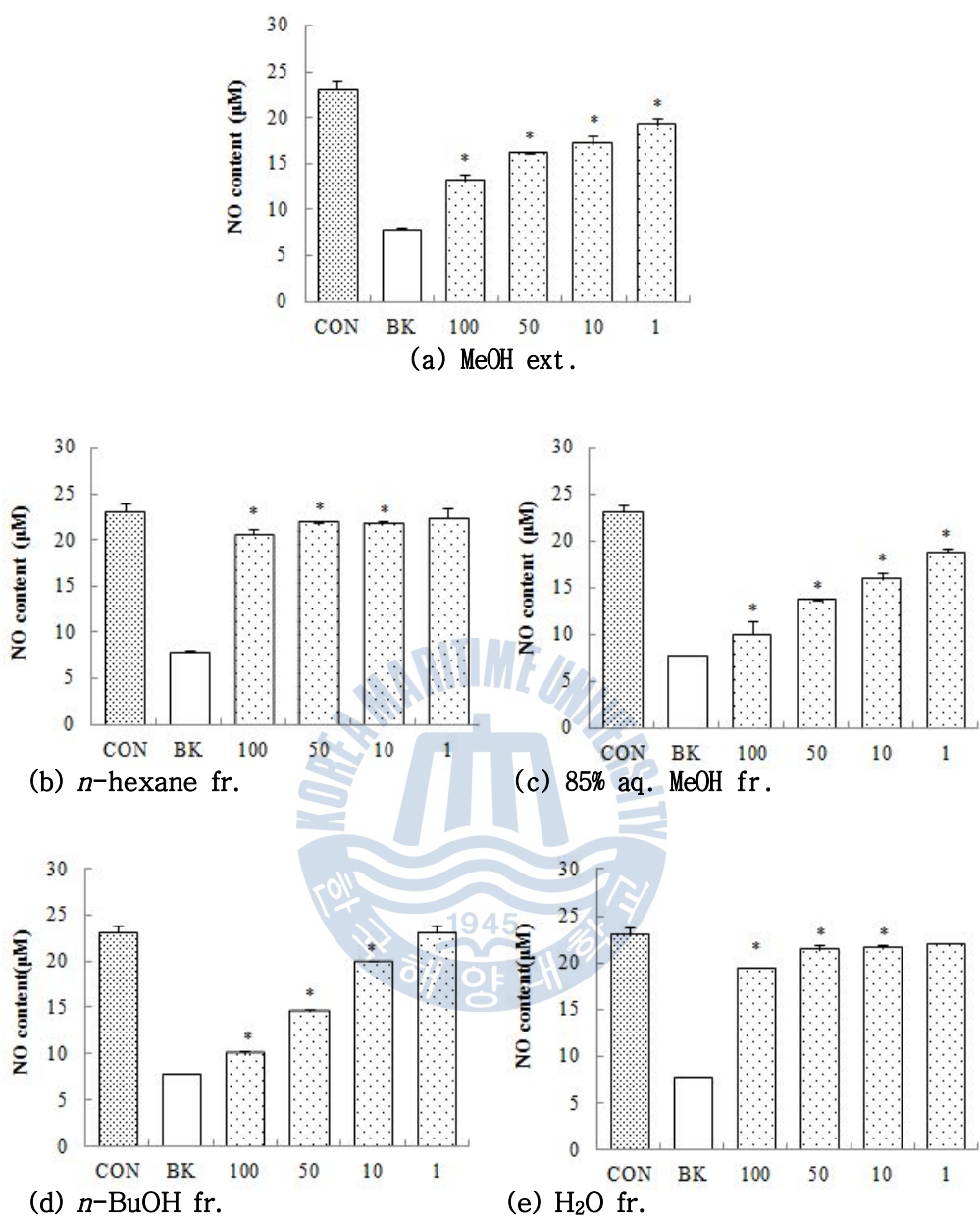


Fig. 43. Effects of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on Nitrite production in Raw 264.7 cells. (100, 50, 10, 1 μg/mL)

* $p < 0.05$, significant effect between the control and each fractions

(2) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

감태 추출물이 Raw 264.7 cell에서 전염증성 인자에 미치는 영향을 확인하기 위하여 조추출물과 4개의 분획물 각각을 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 iNOS 유전자의 발현을 확인하였다. Housekeeping 유전자로서 GAPDH를 사용하였으며, 이들의 발현 정도를 밀도로 측정한 후 iNOS / GAPDH의 %로 나타내었다. *n*-BuOH fraction에서 iNOS mRNA 발현이 현저히 감소됨을 확인하였으며, 이는 NO 함량 측정에서 보이는 억제 효과와 동일하게 나타남을 알 수 있었다. 또한 조추출물과 85% aq. MeOH fraction에서도 iNOS 유전자 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 44.).

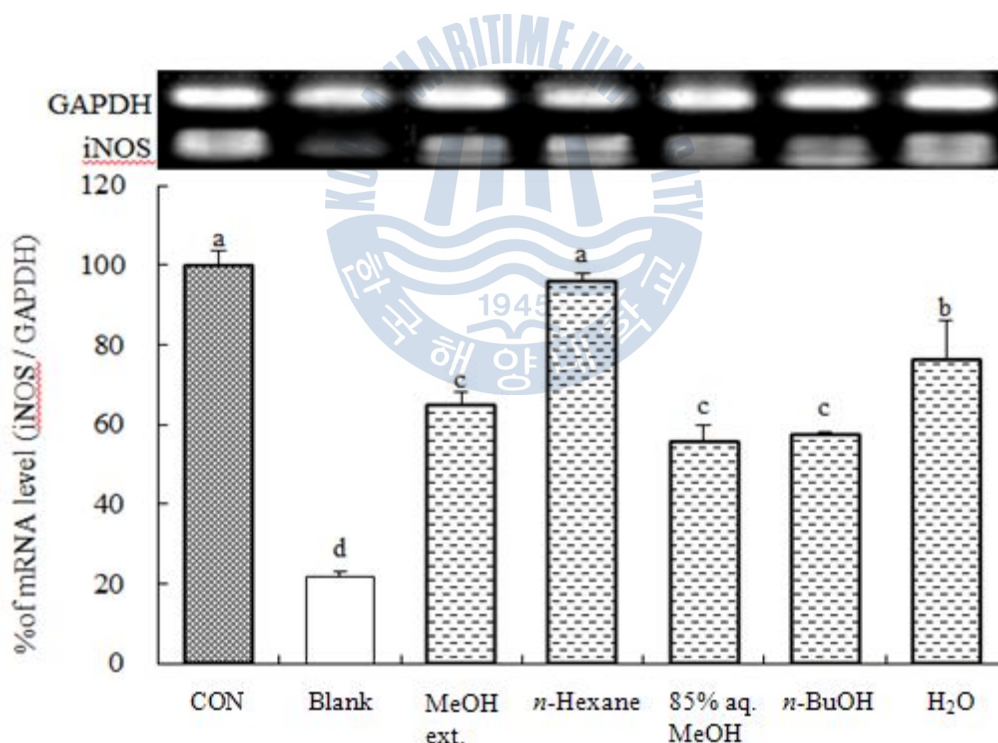


Fig. 44. Effects of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on production of iNOS in Raw 264.7 cells. (100 $\mu\text{g/mL}$)

3-5. HT-1080 세포 침윤 억제 효과

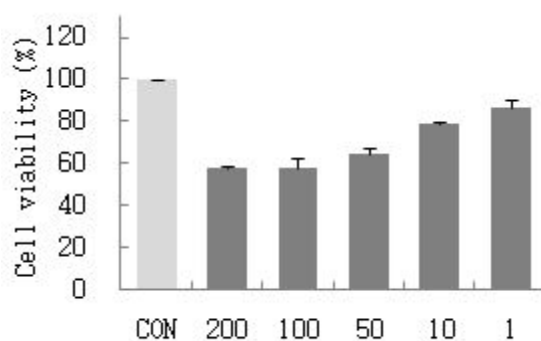
(1) 감태 조추출물과 용매분획의 활성

1) HT-1080 cell에 대한 조추출물과 용매분획물의 MTT assay 효과

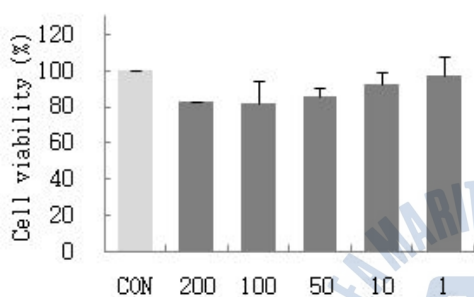
HT-1080 cell에 대한 cell viability 측정에서는 모든 sample의 각 농도에서 대조군과 유사한 흡광도를 나타내어 HT-1080 cell viability에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며(**Fig. 45**), *n*-hexane, *n*-BuOH, H₂O fraction에서는 200 µg/mL의 농도에서 80% 이상의 높은 값을 나타내어 cell viability에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

MTT assay를 측정하여 얻어진 cell viability의 측정결과를 바탕으로 HT-1080 cell에 대하여 gelatin zymography 및 MMP-2, MMP-9의 발현을 확인하였다.

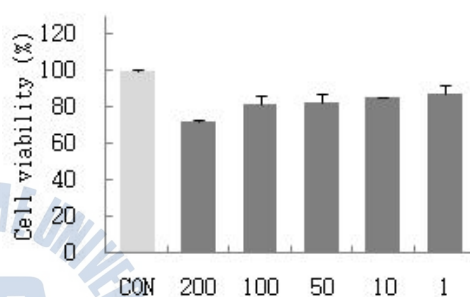




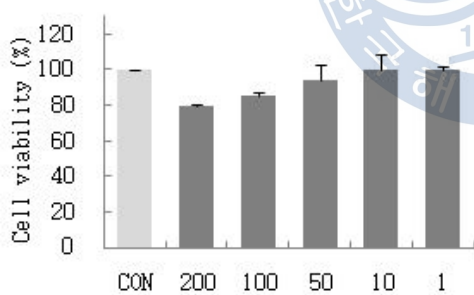
(a) MeOH ext.



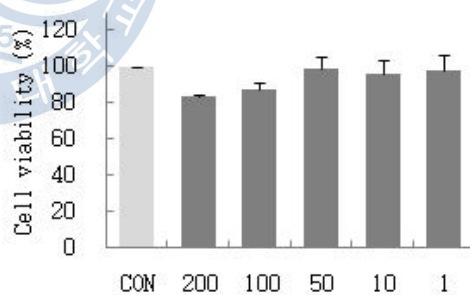
(b) *n*-hexane fr.



(c) 85% aq. MeOH fr.



(d) *n*-BuOH fr.



(e) H₂O fr.

Fig. 45. Effects of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on viability of HT-1080 cell. (200, 100, 50, 10, 1 µg/mL)

2) Gelatin zymography

감태 분획물이 종양 세포의 침윤과 전이에 미치는 영향을 검색하기 위하여 HT-1080 cell에 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O fraction을 각각 200, 100, 50, 10, 1 µg/mL의 농도로 처리하여 배양한 배양액을 채취하여 MMP 활성을 gelatin zymography법으로 실험하였다. *n*-BuOH fraction은 농도 의존적으로 MMP 활성을 감소시키는 것으로 확인되었다. 85% aq. MeOH fraction은 농도 의존적으로 그 활성이 나타나기는 하였지만 *n*-BuOH 비교하였을 때 유의적이지는 않았다. H₂O fraction의 경우에는 농도에 따른 MMP 활성에 변화가 없었다(Fig. 46.).



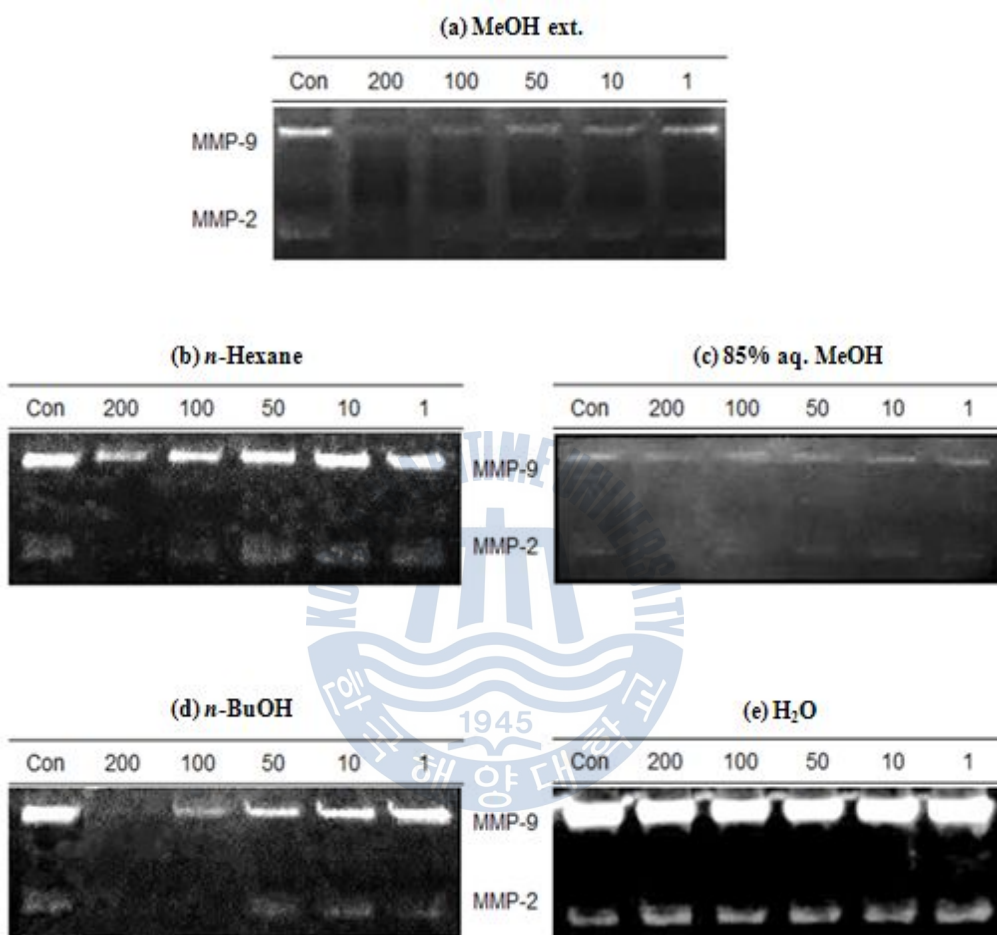


Fig. 46. Effects of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on inhibition of MMP-2 and MMP-9 in HT-1080 cells. (200, 100, 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$)

3) MMP-2와 MMP-9의 RT-PCR

감태 추출물이 HT-1080 세포 침윤 인자에 미치는 영향을 확인하기 위하여 조추출물과 4개의 용매분획 각각을 50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 MMP-2와 MMP-9 유전자의 발현을 확인하였다. Housekeeping 유전자로서 GAPDH를 사용하였으며, 이들의 발현 정도를 밀도로 측정한 후 MMP-2, 9 / GAPDH의 %로 나타내었다. 조추출물과 85% aq. MeOH fraction, *n*-BuOH fraction의 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 MMP-2와 MMP-9의 발현이 현저히 감소됨을 확인하였으며, 특히 *n*-BuOH fraction에서 MMP-9의 발현이 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도일 때 50% 이상 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 47, 48.).



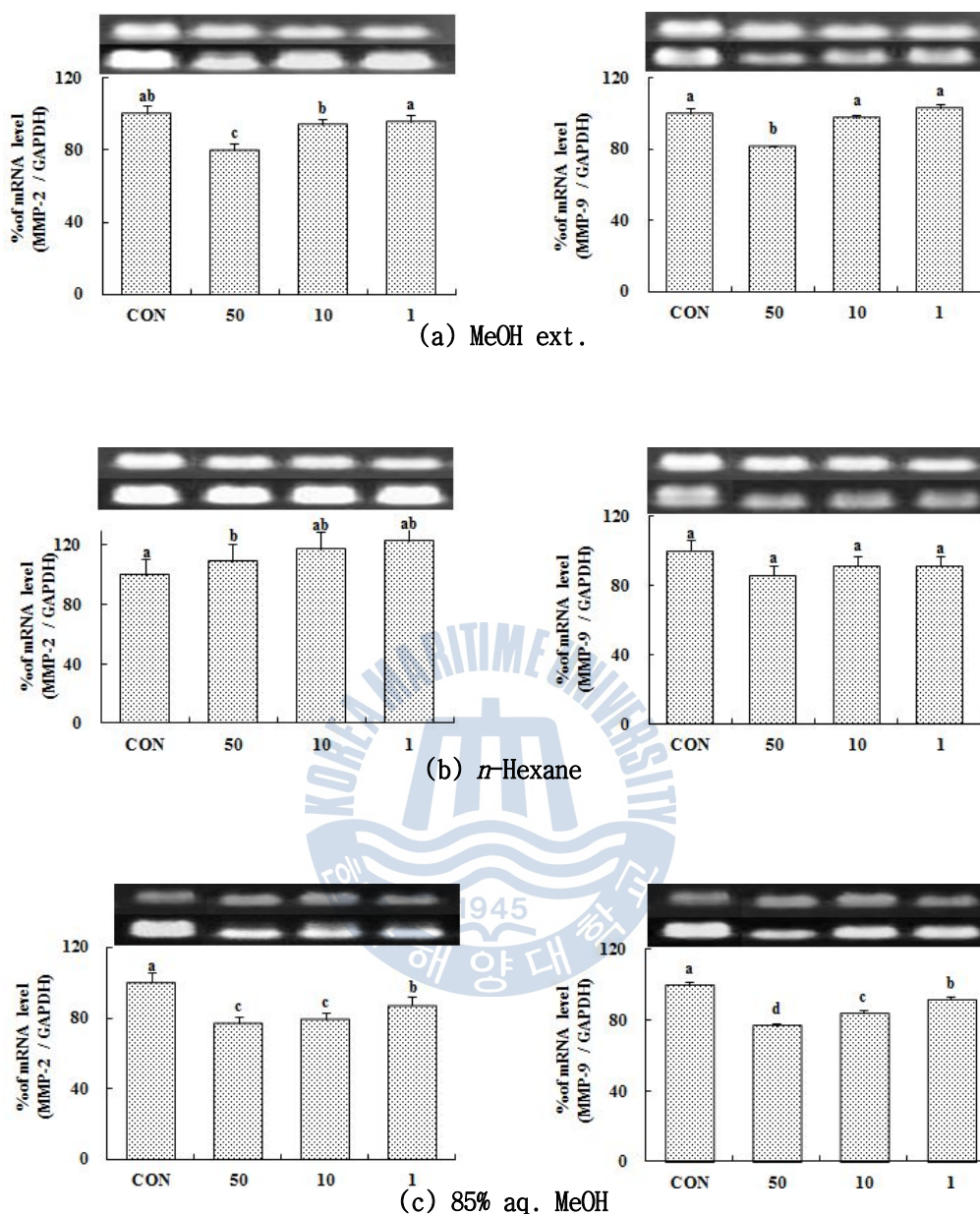
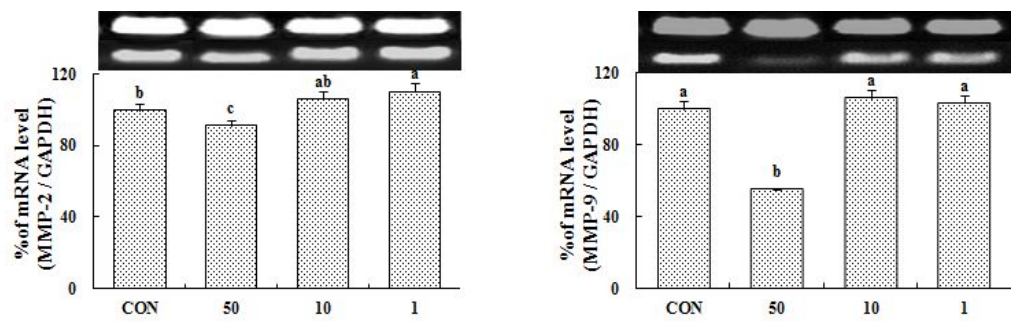
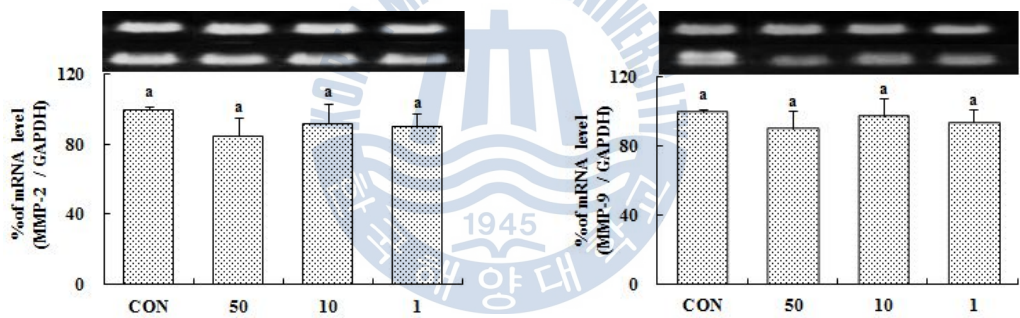


Fig. 47. Inhibition effects of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in HT-1080 cells. (50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$)

a-d Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means \pm SD ($n=3$)



(d) *n*-BuOH



(e) H_2O

Fig. 48. Inhibition effects of crude extract and its solvent fractions from *E. cava* on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in HT-1080 cells. (50, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$)

a-c Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means \pm SD ($n=3$)

(2) 감태에서 분리한 compounds 2-6의 활성

1) HT-1080 cell에 대한 compounds 2-6의 MTT assay 효과

HT-1080 cell에 대하여 *n*-BuOH fraction에서 분리한 5개의 화합물의 cell viability를 측정하였다. 200, 100, 50, 10, 1 μ M의 농도로 측정하였으며, 100 μ M 이하의 농도에서 compound 2와 5는 cell viability에 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, compound 3은 80% 이상의 생존율을 나타내어 cell viability에 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. compound 4는 100 μ M의 농도에서 69%의 cell viability를 나타내었으며, 50, 10, 1 μ M의 농도에서는 80% 이상의 cell viability를 나타내었다. compound 6은 100 μ M의 농도에서 72%의 cell viability를 나타내었으며, 50, 10, 1 μ M의 농도에서는 90% 이상의 cell viability를 나타내는 것으로 확인하였다. 이를 통해 전반적으로 100 μ M 이하의 농도에서는 HT-1080 cell의 viability에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 49.).

MTT assay를 통하여 얻어진 결과를 바탕으로 gelatin zymography 실험을 수행하였다.

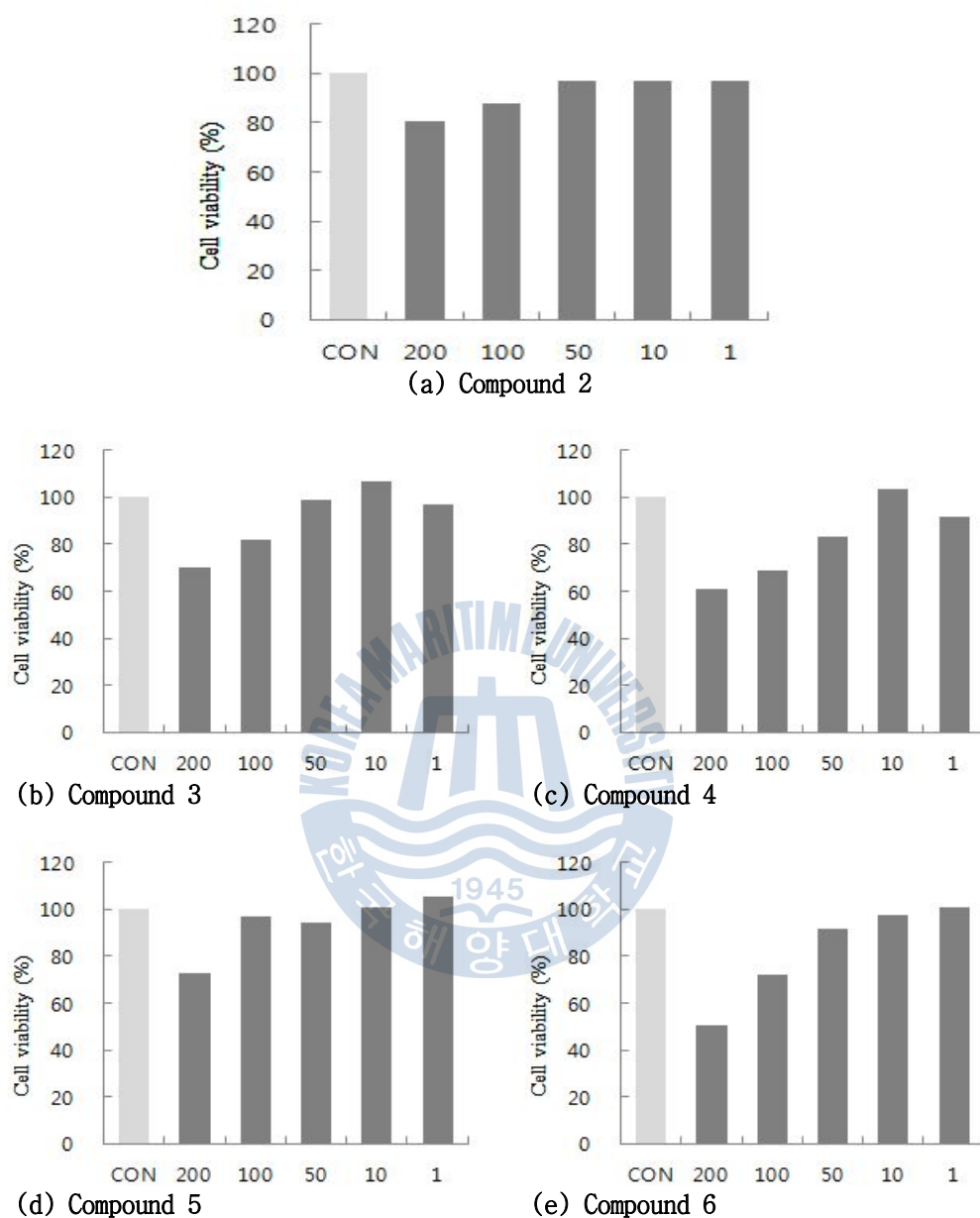


Fig. 49. Effects of compounds 2-6 from *E. cava* on viability of HT-1080 cells. (200, 100, 50, 10, 1 μM)

2) Gelatin zymography

Compound **2-6**이 종양 세포의 침윤과 전이에 미치는 영향을 검색하기 위하여 HT-1080 cell에 compound **2-6**을 각각 200, 100, 50, 10, 1 μ M의 농도로 처리하여 배양한 배양액을 채취한 후 MMP 활성을 gelatin zymography법으로 실험하였다. 모든 화합물에서 농도 의존적으로 MMP-2와 9의 활성을 억제시키는 것으로 확인되었다. 특히, compound **5**의 경우 세포독성이 없는 것으로 확인되었던 100 μ M의 농도에서 MMP-2의 활성을 높은 수준으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 46.).



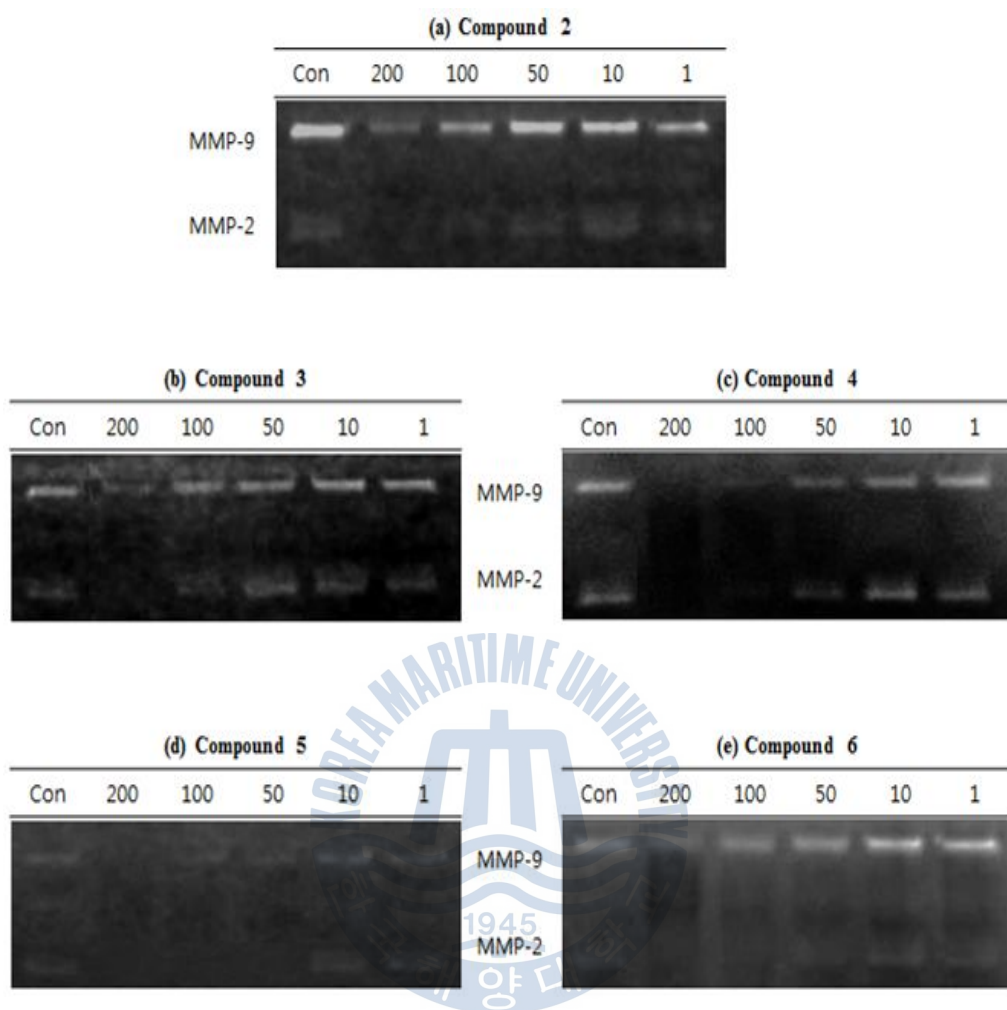
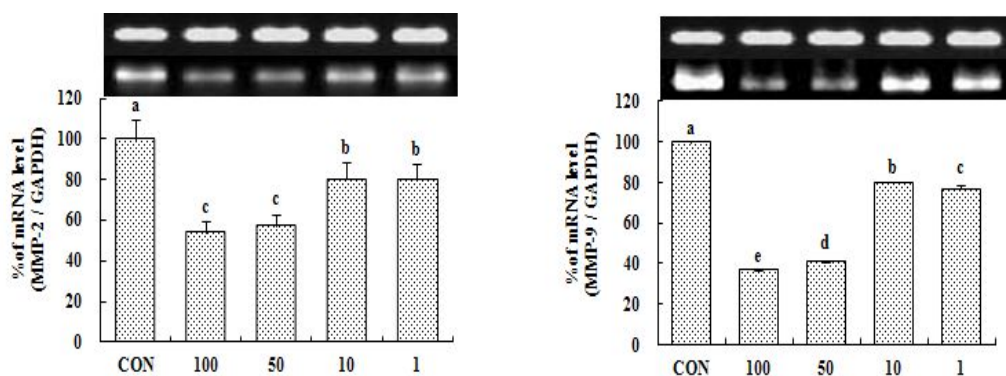


Fig. 50. Inhibition effects of compounds 2-6 isolated from *E. cava* on MMP-2 and MMP-9 in HT-1080 cells. (200, 100, 50, 10, 1 μ M)

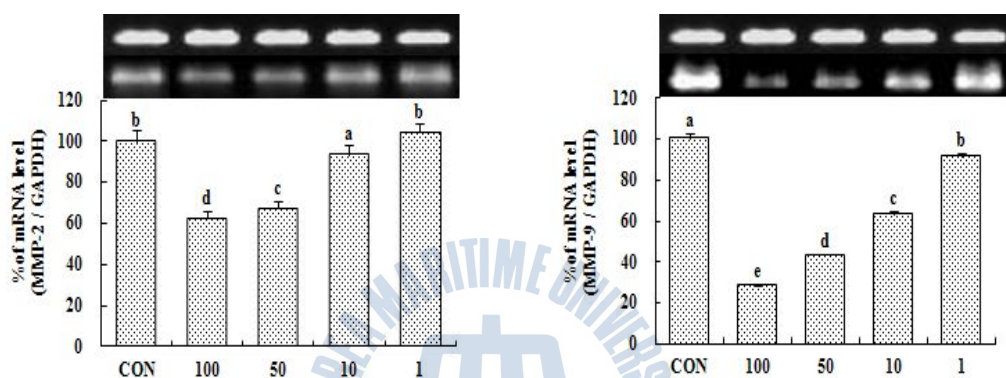
3) MMP-2와 MMP-9의 RT-PCR

Compound 2-6이 HT-1080 세포 침윤 인자에 미치는 영향을 확인하기 위하여 5개의 화합물을 각각 100, 50, 10, 1 μ M의 농도로 처리하여 MMP-2와 MMP-9 유전자의 발현을 확인하였다. Housekeeping 유전자로써 GAPDH를 사용하였으며, 이들의 발현 정도를 밀도로 측정한 후 MMP-2, 9 / GAPDH의 %로 나타내었다. 모든 화합물에서 세포 침윤 억제제의 활성이 관찰되었다. 특히, compound 3, 6에서 MMP-2와 MMP-9이 모두 높은 수준으로 억제되는 것이 확인되었으며, compound 4와 compound 5의 경우에는 각각 MMP-9와 MMP-2에 대한 억제 효과는 나타난 반면 compound 4에서는 MMP-2가, compound 5에서는 MMP-9에 대한 억제 효과가 나타나지 않는 것이 확인되었다(Fig. 51, 52.).

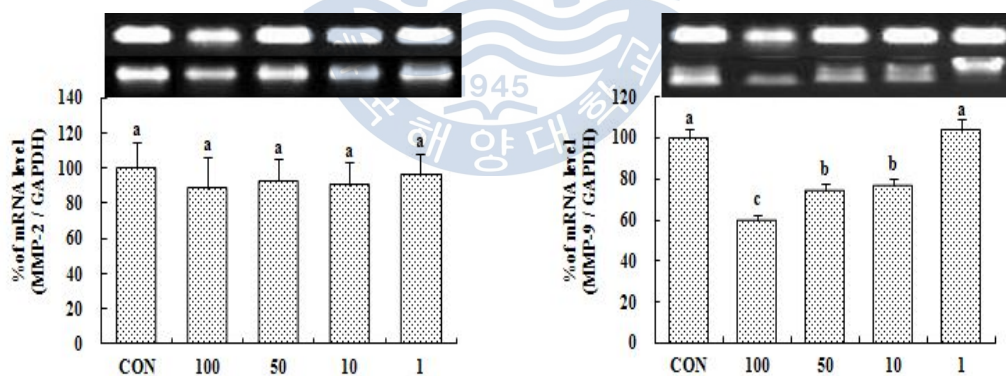




(a) Compound 2



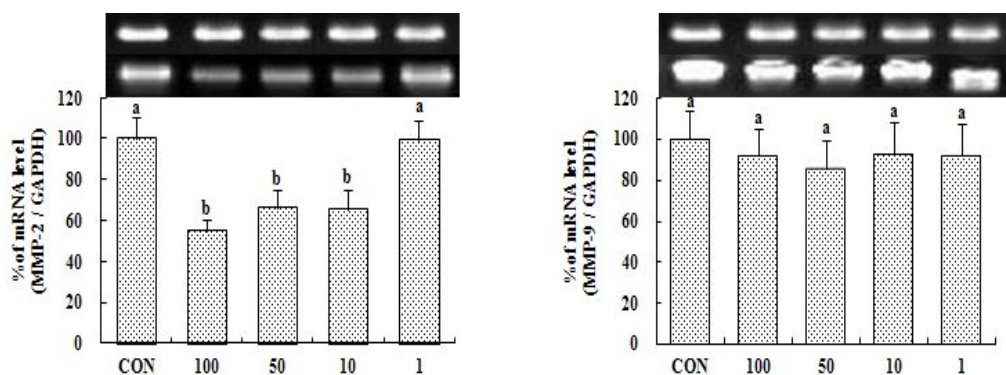
(b) Compound 3



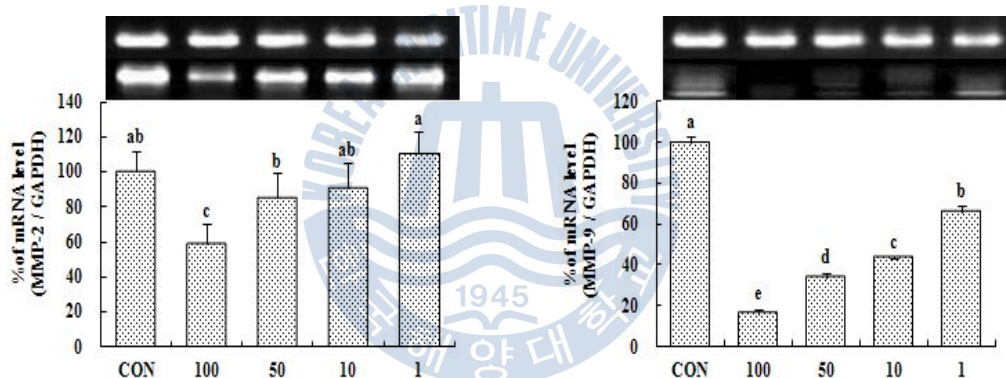
(c) Compound 4

Fig. 51. Inhibition effects of compounds 2-6 isolated from *E. cava* on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in HT-1080 cells. (100, 50, 10, 1 μM)

a-c Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means \pm SD (n=3)



(d) Compound 5



(e) Compound 6

Fig. 52. Inhibition effects of compounds 2-6 isolated from *E. cava* on MMP-2 and MMP-9 mRNA expression in HT-1080 cells. (100, 50, 10, 1 μ M)

a-c Means with the different letters in the same concentration are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. Values are means \pm SD (n=3)

4. 요약 및 결론

갈조류인 감태(*Ecklonia cava*)는 최근 항산화제로서 급부상하고 있는 해조류 유래 polyphenol을 다량 함유하고 있는 것으로 밝혀지면서 세간의 관심을 받고 있는 해조류이다. 해조류유래 polyphenol은 육상식물 중 항산화 활성이 가장 높다고 알려진 EGCG(녹차 추출물, Epigallocatechin gallate)보다 무려 4배나 높은 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이러한 관점에서 부산의 기장 지역과 제주 지역에서는 오래전부터 곰피(*Ecklonia stolonifera*)와 함께 식용으로 많이 이용되어져 오고 있는 감태로부터 이 해조류가 생성하는 이차 대사산물 중 polyphenol계 화합물을 집중적으로 분리하여 이들이 가지는 여러 가지 생리학적 활성을 검색해서 각 화합물이 가지는 산업적 활용 가능성을 검토하였다.

제주 귀덕에서 채집된 감태를 구입하여 환류조건하에서 MeOH 용매로 추출하여 조추출물을 얻었으며, 이를 극성 순서에 따라 *n*-hexane, 85% aq. MeOH, *n*-BuOH, H₂O의 4개 fraction으로 분획하였다. 이들에 대한 DPPH radical 소거 활성과 peroxynitrite 소거 활성을 측정한 결과 *n*-BuOH fraction에서 가장 높은 소거 활성을 보였다. 이는 각 분획물에 대해 실시한 polyphenol함량 측정의 결과에서 *n*-BuOH fraction의 polyphenol 함량이 다른 fraction보다 월등히 많이 나타난 것과 상응하는 결과로써 이들 실험결과와 ¹H NMR data 분석을 토대로 하여 *n*-BuOH fraction에 대하여 우선적으로 화합물을 분리하기로 하였다. 먼저 *n*-BuOH fraction을 silica column chromatography를 통해 10개의 subfraction으로 나누었으며, 그 중 10% MeOH in CHCl₃ subfraction을 sephadex LH20 column chromatography하여 compound 4를 분리하였으며, 이를 다시 sephadex LH20 column chromatography하여 compound 1을 분리하였다. 나머지 subfraction 중 20% MeOH in CHCl₃와 30% MeOH in CHCl₃ subfraction을 합하여 다시 silica column chromatography를 실시하였고 7개의 subfraction으로 나누었다. 그 중 15% MeOH in CHCl₃ subfraction을 sephadex LH20 column chromatography하여 compound 2를 분리하였다. 20% MeOH in CHCl₃ subfraction에 대하여서도 sephadex LH20 column chromatography를 실시하여 compound 2, 4를 추가 분리하고 compound 6을 새로 분리하였다. 25% MeOH in CHCl₃ subfraction에 대하여서는 sephadex LH20 column chromatography와 reverse-phased HPLC를 순차적으로 실시하여 compound 2를 추가 분리하고 compound 3과 5를 새로 분리하였다.

세포수준의 항산화 활성을 통해 조추출물과 H₂O fraction을 제외한 모든

fraction들이 ROS에 대하여 높은 소거 활성을 나타내었으며, 항염증 활성을 확인하기 위한 NO 생성 측정 실험에서도 조추출물과 *n*-hexane과 H₂O fraction을 제외한 나머지 용매분획 (85% aq. MeOH와 *n*-BuOH fraction)에서 높은 NO 생성 억제 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 모두 이들 분획물에 포함되어 있는 polyphenol에 기인한 것이라고 예상할 수 있었으며 이에 대한 기존의 연구가 많이 알려져 있기 때문에 후행 연구는 실시하지 않았다.

세포침윤 억제에 대한 활성은 gelatin zymography 실험을 통한 MMP-2와 MMP-9의 발현 정도로 확인할 수 있었으며 *n*-BuOH fraction으로부터 농도 의존적으로 매우 높은 MMP 억제효과를 확인할 수 있었고 *n*-BuOH fraction에서 분리한 compound 2-6 모두에서 HT-1080 세포 침윤 억제 효과가 나타남을 확인할 수 있었다. 특히, compound 2는 HT-1080 세포 침윤에 대한 억제 효과가 우수한 것으로 이미 보고되어져 있으나 (이상훈, 2010), 이번에 새롭게 실험된 compound 3과 compound 6의 경우 MMP-2와 MMP-9에 대하여 이와 유사하거나 더 높은 억제 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

위 실험결과를 토대로 본 연구에 사용된 감태는 세포내 존재하는 활성 산소종을 직접적으로 제거하는 항산화제 및 우수한 항염증제로서 뿐만 아니라 MMP-2와 MMP-9을 포함하여 좀 더 많은 항암 실험과 임상실험을 통하여 우수한 항암 소재로서의 개발이 기대되어진다.



5. 참고문헌

- Babizhayev, M. A., Seguin, M.C., Gueyne, J., Evstigneeva, R. P., Ageyeva, E. A. and Zheltukhina, G. A. L-carnosine (β -alanyl-L-histidine) and carcinine (β -alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *J. Biochem.* **304**:509-913, (1994)
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. **8**:3-11, 1990.
- Beda, N., and Nedospasov, A. A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric oxide*. **13**:93-97, 2005
- Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **25**:1199-1200, 1958.
- Chambers, A. F., and Matrisian, L. M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer. Inst.* **89**:1260-1270, 1997.
- Folin, O., Denis, W. On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* **12**:239-249, 1912.
- Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, K., Mori, H., Nakayama, Y., Takahashi, M. 'Anti-plasmin inhibitor. VI. structure of Phlorofucofuroeckol A, a novel Phlorotannin with both dibenzo-1,4-dioxin and dibenzofuran elements, from *Ecklonia Kurome okamurd*. *Chem. Pharm. Bull.* **38**:133-135, 1990.
- Fukuyama, Y., Kodama, M., Miura, I., Kinzyo, Z., Kido, M., Mori, H., Nakayama, Y., Takahashi, M. Structure of an anti-plasmin inhibitor,

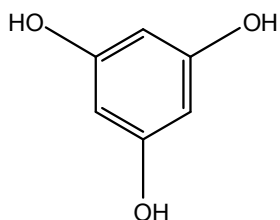
- eckol, isolated from the brown alga *Ecklonia kurome* Okamura and inhibitory activities of its derivatives on plasma plasmin inhibitors. *Chem Pharm Bull.* **37**:349-53, 1989.
- Fukuyama, Y., Miura, I., Kinzyo, Z., Mori, H., Kido, M., Nakayama, Y., Takahashi, M., and Ochi, M. Eckol, Novel phlorotannins with a dibenzo-*p*-dioxin skeleton possessing inhibitory effectis on α_2 -macrohlobulin from the brow alga *Ecklonia kurome okamura*. *Chemistry letters.* 739-742, 1985.
- Herron, G.S., Banda, M.J., Clark, E.J., Gavrilovic, J., Werb, Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J. Bioloical Chemistry.* **25**:2814-8, 1986.
- Kang, H. S., Chung, H. Y., Jung, J. H., Son, B. W., and Choi, J. S. A new phlorotannin from the Brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Chem. Pharm. Bull.* **51**:1012-1014, 2003.
- Kooy, N. W., J. A. Royall, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology & Medicine* **16**:149-156, 1994.
- Kwon, N. S., Stuehr, D. J., and Nathan, C. F. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitirc oxide. *J. Exp. Med.* **174**:761-767, 1991.
- Lee, S. H., Li, Y., Karadeniz, F., Kim M. M., and Kim, S. K. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of phloroglucinal derives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *J. Sci. Food Agric*, **89**:1552-1558, 2009.
- Liotta, L. A. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci AM* **266**:34-41,

1992.

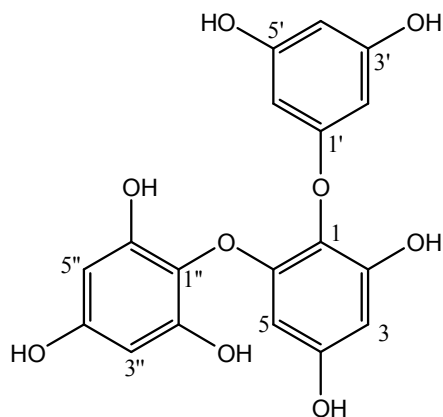
- McCawley, L. J., Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Molecular Medicine Today*. **6**:149-56, 2000.
- Moon, A., Kim, M.S., Kim, T.G., Kim, S.H., Kim, H.E., Chen, Y.Q., Kim, H.R. H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cell: a role for MMP-2 in the H-ras-induced invasive phenotype. *International J. cancer*. **15**:176-81, 2000.
- Nguyem, T., Brunson, D., Crespi, C. L., Penman, B. W., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*. **89**:3030-3034, 1992.
- Ohtsuki, A. T., Yokosawa, E., Koyano, T., Preeprame, S., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Toida, T., and Ishibashi, M. Quinic Acid Esters from *Pluchea indica* with Collagenase, MMP-2 and MMP-9 Inhibitory. *Phytother. Res*. **22**:64-266, 2008
- Okimotoa Y., Watanabea A., Nikia E, Yamashitab T., Noguchia N. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett*. **474**:137-14, 2000.
- Renckens, R., Roelofs, J.J., Florquin, S., de Vos, A.F., Lijnen, H.R., van't Veer, C., van der Poll, T., Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs host defense against abdominal sepsis. *J. Immunology*. **176**:3735-3741, 2006.
- Shanmugam, K., Holmquist, L., Steele, M., Stuchbury, G., Berbaum, K., Schulz, Oliver., Garcia, O. B., Castillo, J., Burnell, J., Rivas, V. G., Dobson, G., and Munch, Gerald. Plant-derived polyphenols attenuate lipopolysaccharide-induced nitric oxide and tumour

- necrosis factor production in murine microglia and macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research*. **52**:427-438, 2008.
- Sil, H., Sen, T., Moulik, S., Chatterjee, A. Black tea polyphenol (theaflavin) downregulates MMP-2 in human melanoma cell line A375 by involving multiple regulatory molecules. *J. Environ Pathol Toxicol Oncol*. **29**:55-68, 2010.
- Sugiura, Y., Matsuda, K., Yamada, Y., Nishikawa, M., Shioya, K., Katsuzaki, H., Imai K., and Amano, H. Isolation of a New Anti-Allergic Phlorotannin, Phlorofucofuroeckol-B, from an Edible Brown Alga, *Eisenia arborea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**:2807-2811, 2006.
- Yoon, S. O., Park, s. J., Yun, C. H., and Chung, A. S. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol*. **36**:128-137, 2003.
- 국가암정보센터. 암발생률 추세 분석 (1999-2007년). 2010.
- 이보한, 백두산, 윤승욱, 신재민, 김자환, 윤세영, 김병하, 김석배, 신정은, 송일한. 간경변증 환자에서 말초혈액 Nitric Oxide 활성도 측정의 의의. *대한내과학회지*. **73**:251-257, 2007.
- 이상훈. Anti-inflammatory mechanism of Phlorotannins derived from *Eisenia bicyclis* and their inhibitory effects on matrix metalloproteinases. 부경대 대학원 박사학위논문, 2010.

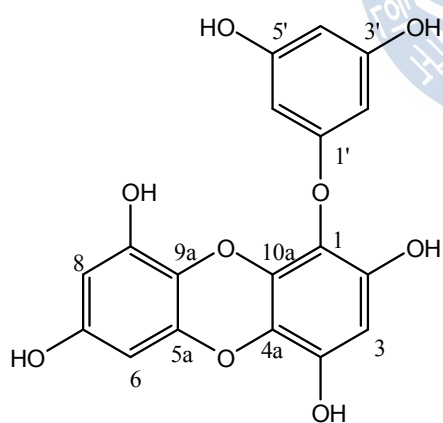
6. 부록



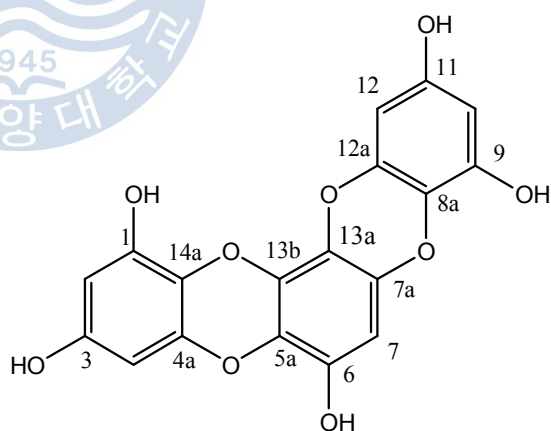
Compound 1
Phloroglucinol



Compound 2
Triphlorethol-A



Compound 3
Eckol



Compound 4
Eckstolonol

Fig. 49. Chemical structure of compounds 1-4 from *E. cava*.

감사의 글

많은 시간과 노력 끝에 향기로운 결실을 얻었습니다.

먼저 이 논문이 완성되기 까지 처음과 끝을 함께 하여 주시면서 부족한 저를 지도하기 위해 노력해 주신 서영완 교수님께 감사를 드립니다. 또한 실험실의 맏이로서 부족할 때 채찍질 해 주고 부족한 부분이 있으면 언제나 속 시원히 해결해 주면서 가장 큰 힘으로 정신적 지주가 되어 준 내 동기 이정임에게 깊은 감사의 마음을 전합니다.

저는 어린 시절부터 무척 복이 많은 사람이었습니다. 특히 사람과의 관계에 있어서 항상 좋은 만남의 연속 속에 이 세상 누구보다도 큰 행운을 누리며 살아 왔습니다. 대학원에 들어와서 안개 속을 헤매는 듯 했던 막연함 속에 갈피를 제대로 잡지 못하는 저에게 나아갈 방향을 제시해 준 유아누나, 대학원 입학 동기로서 가장 많은 시간을 함께하며 가장 큰 의지가 되어준 해진이, 여러 가지 많은 일들로 정신없이 힘들어 할 때 먼저 나서서 많은 일들을 거들어준 명은이, 처음 들어온 남자 후배로서 나 대신 굶은일을 도맡아 해준 고마운 주완이, 방학동안 잠자리를 제공해 준 호준이, 지금은 잠시 떠나 있는 해영이, 막내 명국이. 이들이 제가 누린 행운입니다. 또한 쉽지 않은 실험에 힘들어 할 때 명확한 대안을 제시해 주셨던 공창숙 박사님과 학부생 때부터 많은 지도 편달로 부족한 저에게 지식을 전해 주신 여러 교수님들께도 감사의 마음을 전하며 끝으로 큰 은혜와 사랑으로 나의 힘과 의지가 되어주신 하나님과 사랑하는 나의 가족에게 이 논문을 바칩니다.

이제 졸업을 하고 사회로 한 걸음 발을 내딛으려 합니다. 먼저 졸업하신 선배님들과 함께 이 사회의 기반을 닦으면서 나의 위치에서 누구보다 성실하게 노력하며 부끄럽지 않은 사람이 되도록 노력하겠습니다. 감사합니다.